

Avaliação das Propriedades Antioxidantes do Bagaço de Mirtilo como Potencial Conservante Alimentar

Andreia Fernandes Caldas

Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição

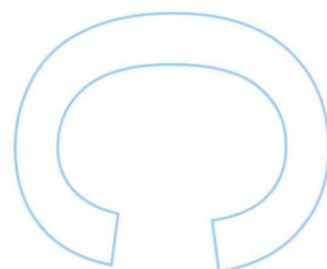
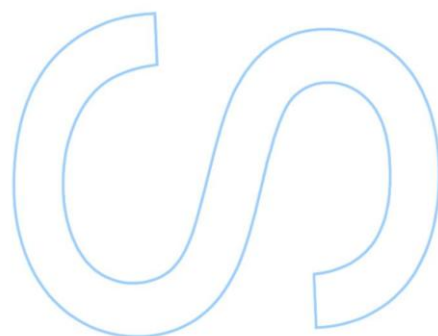
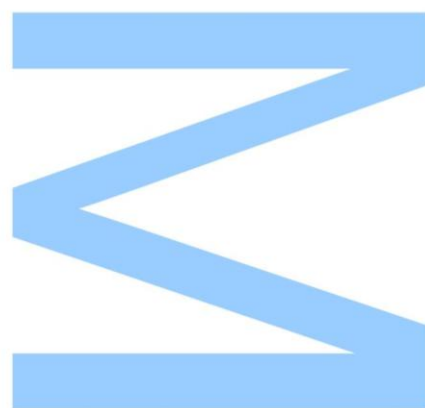
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território
2014

Orientador

Luís Miguel Andrade Magalhães, Investigador do REQUIMTE,
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Coorientador

Luís Miguel Soares Ribeiro Leite da Cunha, Professor Associado,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

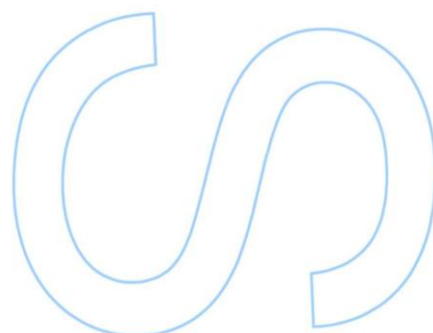
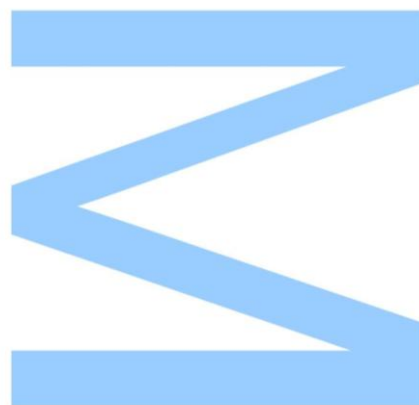




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram
efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Concluído este trabalho, quero e devo agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização.

Assim, em primeiro lugar agradeço aos meus pais e avós por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida e por tornarem possível a concretização deste meu objetivo.

Ao João pela paciência e carinho.

Agradeço ao Doutor Luís Magalhães por todo o seu profissionalismo, apoio, empenho, competência e dedicação demonstrada em todos os momentos na orientação do presente trabalho.

Ao Prof. Doutor Luís Cunha pela disponibilidade e amabilidade demonstrada na transmissão de conhecimentos.

Agradeço à Prof. Doutora Marcela Segundo, pela amabilidade e disponibilidade demonstrada durante todo o processo laboratorial.

Um agradecimento especial também aos laboratórios que me permitiram a realização dos trabalhos experimentais, mais propriamente ao laboratório de Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Ao Hernán Tournour pelo apoio e companheirismo.

Resumo

A deterioração oxidativa dos alimentos é responsável pela formação de compostos que alteram as suas características organoléticas, diminuindo o seu valor nutricional. Para combater os processos de oxidação são utilizados antioxidantes de origem sintética como o butilato de hidroxitolueno (BHT), butilato de hidroxianisol (BHA) e tercbutil-hidroquinona (TBHQ). Contudo, devido à toxicidade dos antioxidantes sintéticos e à preferência do consumidor por produtos naturais, a investigação sobre a utilização de compostos provenientes de fontes naturais tem sido intensificada na última década, com particular interesse nos resíduos agroindustriais. O mirtilo é um fruto com reconhecidas propriedades antioxidantes potenciada pelos compostos bioativos que o constituem (antocianinas, flavonoides e ácido ascórbico). O bagaço de mirtilo, resíduo obtido após a produção do sumo, constituído pelas películas e grainhas representa uma fonte natural rica em compostos fenólicos.

Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar as potencialidades do extrato aquoso de bagaço de mirtilo como conservante alimentar, em particular na prevenção da oxidação proteica. A amostra de mirtilo do género *Vaccinium corymbosum* da variedade Brigitta colhida em Monção foi liquidificada para separar o bagaço da polpa. Após a obtenção do bagaço (seco a 55°C, triturado e tamisado (0,7 – 1,4 mm)), procedeu-se ao estudo das condições de extração (tipo de solvente, pH, tempo de extração). Os resultados obtidos indicam que o maior teor de compostos fenólicos foi extraído com o solvente etanol/água pH 2,0 (50/50, v/v) e com um tempo de extração de 90 min ($25,3 \pm 0,7$ mg /g bagaço de mirtilo).

Após otimização das condições de extração, procedeu-se à extração do bagaço de mirtilo de forma a obter um resíduo seco que foi posteriormente dissolvido com água ou com solução de lecitina a 0,3% (emulsionante). Para ambos os extratos foi determinado o teor de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante pelo método ABTS e a capacidade sequestrante para os radicais peróxido. Verificou-se que o uso do agente emulsionante não aumentou o teor de CFT dissolvidos em solução aquosa assim como a capacidade antioxidante determinada foi similar ao meio sem agente emulsionante.

As propriedades antioxidantes do extrato de bagaço de mirtilo foram determinadas na presença de um substrato proteico (peptona) com o objetivo de determinar qual o tipo de proteção conferida pela amostra ao modelo proteico. Verificou-se que o teor de CFT da mistura (peptona + mirtilo) resulta do somatório dos grupos fenólicos presentes na proteína e na amostra, tal como para a capacidade

sequestrante de radicais peróxido. Conclui-se, assim, que existe um efeito aditivo nas propriedades antioxidantes pela adição do mirtilo ao substrato proteico.

Por último, foi avaliado a estabilidade do bagaço e do extrato de mirtilo ressuspendido em água e lecitina armazenados a -18°C durante 6 meses. Verificou-se uma diminuição do teor de CFT do bagaço de mirtilo de $20,3 \pm 0,3$ para $16,9 \pm 0,4$ mg ácido gálico /g bagaço mirtilo, correspondente a um decréscimo de 17%. Relativamente ao resíduo seco de mirtilo dissolvido em meio aquoso e em solução de lecitina a 0,3%, o decréscimo observado foi de 41 e 30%, respetivamente.

Palavras-chave: mirtilo (*Vaccinium corymbosum*), antioxidante, extrato aquoso, compostos fenólicos, peptona

Abstract

The oxidative deterioration of foods is responsible for the formation of compounds that change their organoleptic properties, decreasing its nutritional value. To counteract the oxidative processes, several antioxidant compounds of synthetic origin are used as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butyl-hydroquinone (TBHQ). However, due to their toxicity and the preference of consumers for natural products, the research studies about natural sources of antioxidants has been intensified in the last decade, particularly for those from agro-industrial residues. Blueberry is a fruit with recognized antioxidant properties due to its high content in bioactive compounds such as anthocyanins, flavonoids and ascorbic acid. Blueberry pomace, corresponding to the residue containing the skins and grape seeds, is an interesting natural source of phenolic compounds.

In this context, the main objective of this study was to evaluate the potential of the blueberry pomace aqueous extract as a food preservative, particularly in the prevention of protein oxidation. The blueberry, *Vaccinium corymbosum*, from variety Brigitta was harvested in Monção and it was liquefied to separate the pulp from pomace. After obtaining pomace (dried at 55°C, crushed and sieved (0.7-1.4 mm)), the extraction conditions including type of solvent, pH and extraction time were studied. The results indicated that the higher content of phenolic compounds were extracted with ethanol/water pH 2.0 (50/50, v/v) during 90min (25.3 ±0.7 mg/g blueberry pomace).

After that, the blueberry pomace was extracted in order to obtain a dry residue which was further dissolved with water or with a solution of 0.3% lecithin (emulsifier). For both extracts, the content of total phenolic compounds (TFC), antioxidant capacity by ABTS method and the ability for scavenging peroxy radicals were determined. The emulsifying agent does not increase the content of TFC dissolved in aqueous solution as well as the antioxidant capacity determined was similar to that obtained in the absence of emulsifying agent.

The antioxidant properties of blueberry pomace extract were determined in the presence of a protein substrate (peptone) in order to determine what type of protection was provided by the sample to the protein model. It was found that, the TFC of the mixture (peptone + blueberry) results from the sum of phenolic groups present in the protein and sample. Similar results were obtained for peroxy radical scavenging capacity. Hence, there is an additive effect on antioxidant properties provided by the addition of blueberry to protein substrate.

Finally, the stability of pomace and blueberry extract dissolved in lecithin solution and in water stored at -18 °C during 6 months was analysed. The TFC of blueberry pomace decreased from 20.3 ± 0.3 to 16.9 ± 0.4 mg gallic acid/g of blueberry pomace, corresponding to a decrease of 17%. For dry weight of blueberry dissolved in water and in a solution of lecithin 0.3%, the observed decrease was 41 and 30%, respectively.

Keywords: blueberry (*Vaccinium corymbosum*), antioxidant, aqueous extract, phenolic compounds, peptone

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	6
Índice	8
Índice de Abreviaturas	9
Índice Figuras	10
Índice Tabelas	11
Introdução.....	12
Enquadramento Teórico.....	12
Mirtilo	21
Taxonomia e descrição botânica.....	21
Produção do fruto	22
Caraterização química	23
Indústria alimentar e farmacêutica	25
Extratos de resíduos agroindustriais	26
Objetivo e âmbito.....	28
Materiais e métodos.....	29
Reagentes, soluções e equipamentos	29
Tratamento da amostra de mirtilo	30
Determinação do teor de compostos fenólicos totais	31
Determinação da capacidade antioxidante (ABTS)	34
Cálculo da capacidade antioxidante total	34
Capacidade sequestrante dos radicais peróxido (ORAC).....	35
Resultados e discussão	38
Estudo das condições de extração.....	38
Avaliação das propriedades antioxidantes do resíduo seco do extrato de bagaço de mirtilo	41
Estabilidade do bagaço de mirtilo e do extrato aquoso do resíduo seco	43
Avaliação das propriedades antioxidantes do resíduo seco de bagaço de mirtilo na presença de um modelo proteico	45
Conclusão.....	48
Referências bibliográficas	49

Índice de Abreviaturas

AH – Antioxidante

AAPH – 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina)dicloridrato

ABTS – ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AUC – *Area under curve*

BHA – Butilato de hidroxianisol

BHT – Butilato de hidroxitolueno

CFT – Compostos fenólicos totais

ERO – Espécies reativas do oxigénio

FAO – Food and Agriculture Organization

HO[•] – Radical hidroxilo

JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives

ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

R[•] – Radical alquil

ROO[•] – Radical peroxilo

TBHQ – Tercbutil-hidroquinona

WHO – World Health Organization

Índice Figuras

Figura 1. Classificação dos antioxidantes.	17
Figura 2. Estrutura molecular dos antioxidantes sintéticos.....	17
Figura 3. Mirtilo (<i>Vaccinium sp</i>).....	21
Figura 4. Principais antocianinas encontradas na natureza.	24
Figura 5. Estrutura molecular da L- α -lecitina.....	26
Figura 6. Curva de calibração de ácido gálico.....	32
Figura 7. Curva de calibração da peptona.	33
Figura 8. Relação entre a variação de absorvância a 734 nm ao fim de 300 min de tempo reacional e a concentração de Trolox.	35
Figura 9. Perfil cinético da oxidação da fluoresceína pelos radicais peroxilo derivados do AAPH na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes de extrato de mirtilo.	36
Figura 10. Compostos fenólicos totais (CFT) obtido para os diferentes tipos de solvente ao longo do tempo de extração.....	38
Figura 11. Compostos fenólicos totais (CFT) obtido para diferentes percentagens de etanol (20, 50 e 80%, v/v).	40
Figura 12. Compostos fenólicos totais (CFT) do bagaço de mirtilo determinado após a obtenção do bagaço (Dez-2013) e após 6 meses (Jun-2014).....	43
Figura 13. Compostos fenólicos totais (CFT) do extrato aquoso do resíduo seco do bagaço de mirtilo com e sem lecitina determinado num intervalo de 6 meses (Janeiro e Julho 2014).....	44
Figura 14. Compostos fenólicos totais (CFT) para mirtilo (0,035 a 0,135 g/L, concentrações no poço), peptona (0,050 a 0,50 g/L, concentrações no poço) e peptona (0,050 g/L) + mirtilo (0 a 0,135 g/L).	45

Índice Tabelas

Tabela 1. Descrição das características do mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i>).	22
Tabela 2. Resultados do teor de compostos fenólicos totais (CFT), da capacidade antioxidante e da capacidade de sequestrar radicais peróxido.	42

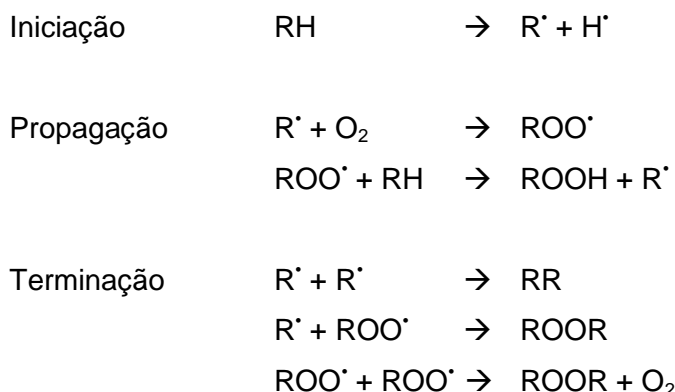
Introdução

Enquadramento Teórico

A deterioração oxidativa dos alimentos é responsável pela geração de odores e sabores rançosos (*off-flavors*), além do desenvolvimento de substâncias tóxicas, como a acroleína, malonaldeído e os óxidos de colesterol. Isso diminui as qualidades organoléticas e nutricionais dos alimentos processados, causando mudança na sua coloração e textura [1]. O desenvolvimento dessas substâncias deve-se a processos oxidativos onde por interação de iões metálicos (Fe^{2+} e Cu^+) com peróxido de hidrogénio ocorre a formação de radicais livres derivados do oxigénio que levam à degradação da matriz alimentar. Essa degradação ocorre devido à oxidação lipídica que se caracteriza pela formação de dienos conjugados, hidroperóxidos e aldeídos, assim como à oxidação proteica que depende da natureza dos aminoácidos [2].

Nos alimentos, os lípidos desempenham funções importantes contribuindo para a qualidade do alimento, aos quais conferem características específicas que o tornam desejável, como o sabor, o aroma, a cor e a textura. Os lípidos, nutricionalmente também são importantes, pois servem como fonte de energia para o metabolismo, como meio de transporte de vitaminas lipossolúveis e são a fonte de ácidos gordos essenciais, como o linoleico, linolénico e araquidónico [3].

A oxidação lipídica é uma das maiores causas de danos químicos dos produtos alimentares, resultando em rancificação e perda de qualidade nutricional com alterações na cor, odor e sabor, colocando em causa a segurança dos alimentos [1]. Quando oxidados, os lípidos originam produtos primários e secundários que afetam negativamente estas funções. Em geral, a oxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação [4]. No processo de iniciação, o átomo de hidrogénio α -metilénico é separado da molécula lipídica para formar um radical livre alquil (R^\bullet). O radical lipídico é altamente reativo podendo reagir com o oxigénio atmosférico (O_2), produzindo um radical peroxilo (ROO^\bullet). Nas reações de propagação, o radical peroxilo (ROO^\bullet) reage com outra molécula de lípido insaturado para formar um hidroperóxido e um novo radical lipídico instável. Em cada reação é originado um novo radical livre o que leva à incorporação de mais oxigénio no sistema, resultando num mecanismo de reação cíclica. Os hidroperóxidos são instáveis e podem degradar-se em radicais que aceleram a reação de propagação. A terminação ocorre apenas quando dois radicais livres se combinam para formar um produto não radicalar, termodinamicamente estável [4].



em que: RH , ácido gordo insaturado; R^{\bullet} , radical alquil livre; ROO^{\bullet} , radical peróxido; $ROOH$, hidroperóxido.

A natureza, a proporção e o grau de ácidos gordos insaturados presentes nos alimentos vão indicar a suscetibilidade do produto à deterioração oxidativa [1]. Isto porque a rancificação oxidativa não ocorre normalmente em ácidos gordos saturados, uma vez que a formação de um radical livre é energeticamente desfavorável. Apenas sob condições drásticas de temperatura, por rutura homolítica da ligação C-H de uma cadeia carbónica saturada, pode ocorrer a formação do radical livre. Contudo, a presença de ligações duplas nos ácidos gordos insaturados, reduz a energia necessária para a rutura homolítica das ligações C-H na posição alílica, viabilizando sua oxidação [1]. Assim, quanto mais alta a proporção e grau de ácidos gordos insaturados, mais suscetível se torna o alimento de sofrer oxidação.

O aumento da temperatura também aumenta a taxa de autooxidação, afetando a cadeia de formação de hidroperóxidos e a sua decomposição. Isso explica-se pelo facto de que um aumento inicial de temperatura acelera dois fatores: as reações de propagação em cadeia e a decomposição dos peróxidos, resultando num aumento da concentração de radicais livres disponíveis para o início e a disseminação das cadeias de reação [5]. Manter o produto a baixas temperaturas (refrigeração e congelamento), não impede a oxidação lipídica, apenas permite que esta ocorra a uma velocidade reduzida. Dessa forma, o uso de baixas temperaturas no armazenamento de carnes mostra-se necessário, não só para evitar a deterioração microbiológica, mas também para retardar a deterioração oxidativa.

O processo de cozimento leva ao aumento significativo na oxidação lipídica de carnes e ao desenvolvimento do *warmed-overflavor* de carnes cozidas [6]. A aceleração da oxidação lipídica depois do cozimento é atribuída às modificações

induzidas pelo calor, perturbando o compartimento celular e a exposição dos lípidos das membranas a um ambiente pro-oxidativo, dando-se a ativação termal ou libertação do ferro catalítico da mioglobina e a inativação térmica das enzimas antioxidantes [7].

A presença de oxigénio é fator fundamental para que ocorra o processo de oxidação lipídica. A utilização de embalagens a vácuo, atmosfera inerte (nitrogénio) e materiais com baixa permeabilidade ao oxigénio são alternativas recomendáveis para aumentar a vida útil dos alimentos [3]. A embalagem influencia a qualidade e durabilidade das carnes, pois altera o ambiente que envolve o produto, criando condições que retardam as reações de deterioração. Previne a evaporação da humidade do produto, evitando perdas de peso e alterações de aparência, textura e aroma. Contudo, a composição gasosa da embalagem determina a cor do produto, o tipo e a extensão da deterioração microbiológica e a velocidade de oxidação dos seus componentes [3].

A luz acelera o desenvolvimento do ranço em gorduras devido à fotólise dos peróxidos em radicais livres e à decomposição de outros compostos. A luz UV acelera as reações de oxidação e os ácidos gordos polinsaturados formam sistemas conjugados insaturados que absorvem energia acelerando a rutura dos peróxidos [5].

O processamento de produtos cárneos constitui também um dos fatores para a oxidação lipídica. Os produtos emulsionados, moídos ou reestruturados diferenciam-se devido à modificação estrutural do músculo e à exposição dos lípidos num ambiente pro-oxidante. Dessas alterações nos compartimentos celulares resulta a libertação de ferro da mioglobina que apresenta atividade pro-oxidante desencadeando a catálise da oxidação lipídica *in vivo* [8].

A ingestão de alimentos que contêm produtos da oxidação lipídica representam um risco toxicológico crónico para o ser humano. A ingestão de óleos oxidados que contêm hidroperóxidos e aldeídos provoca degeneração hepática e renal, e distúrbios nos níveis séricos de diversas enzimas. Estes aldeídos, especialmente o malonaldeído, são capazes de combinar-se com as mais diversas moléculas dentro do organismo, provocando modificações de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos que resultam na lesão do material genético e mutações. Além de todos estes efeitos, o malonaldeído também está relacionado com a génese das alterações arterioscleróticas [9].

A formação de compostos com grupos carbonilo na carne e seus derivados tem sido ressaltado como uma das mais importantes alterações químicas dos produtos alimentares [3]. A oxidação proteica, similarmente ao que acontece na oxidação

lipídica, é descrita como um processo de reações em cadeia mediada por radicais livres. Contudo, devido à elevada complexidade do substrato e dos mecanismos de oxidação uma maior variedade de compostos podem ser formados. De uma forma geral, o sequestro de um átomo de hidrogénio dos aminoácidos da proteína por um radical livre leva a formação de um radical proteico (eq. 1). Pela reação com o oxigénio, este radical é convertido num radical peroxilo (POO^\bullet) (eq. 2) que pode desencadear a remoção de um átomo de hidrogénio de um aminoácido adjacente, com a produção consequente de novo radical proteico (eq. 3). Este radical pode reagir com outro formando um agregado proteico (ligação cruzada), ou com um produto secundário da oxidação lipídica (aldeído) formando compostos carbonílicos. As reações adicionais com espécies reativas de oxigénio como o radical hidroxilo (HO^\bullet) ou com formas reduzidas de metais de transição (Mn^+) como o Fe^{2+} ou Cu^+ conduzem à formação de um radical alcóxila (PO^\bullet) e seus derivados (eq. 6 e 7). Segue-se de uma forma resumida as principais reações envolvidas na oxidação proteica [10]:



O início do processo de oxidação dos produtos cárneos está diretamente relacionado com a disponibilidade da mioglobina fora do ambiente celular. A mioglobina é a proteína ferro-dependente da carne mais abundante, podendo catalisar reações oxidativas através de vários mecanismos como a autooxidação da oximioglobina a metamioglobina, degradação catalítica de hidroperóxidos lipídicos e atividade de pseudo-peroxidase da mioglobina. A atividade pro-oxidativa da mioglobina está diretamente ligada ao ciclo da cor na carne [10].

Além da presença de mioglobina, metais de transição e lípidos oxidáveis, a oxidação proteica é afetada por outros fatores como o pH, temperatura, atividade da água (a_w) e a presença de inibidores (compostos fenólicos). A luz e a irradiação também são capazes de iniciar a oxidação proteica, contudo ainda não há estudos que revelem qual o impacto físico na oxidação de proteínas cárneas. As proteínas demonstram suscetibilidade intrínseca à produção de compostos carbonílicos, que pode ser atribuída a vários fatores exógenos e endógenos, incluindo a estrutura terciária, composição, sequência e distribuição dos aminoácidos [11].

O desenvolvimento destes processos oxidativos pode ser inibido ou retardado através de diversas estratégias tais como embalagens utilizando vácuo ou atmosfera modificada e o uso de substâncias antioxidantes [3]. Neste contexto, a adição de um conservante natural com elevado teor de compostos com propriedades antioxidantes associado a outras medidas preventivas da oxidação (atmosfera, temperatura e luz) representa uma estratégia de elevado interesse para a indústria alimentar.

Os antioxidantes segundo a FDA (*Food and Drug Administration*) são substâncias utilizadas para preservar e prolongar a vida-útil de alimentos que possuem lípidos oxidáveis, ácidos gordos insaturados, retardando as reações de oxidação [12]. Estes podem agir por sequestro de radicais livres, inativação de iões metálicos, remoção de espécies reativas ao oxigénio (ERO) e destruição de peróxidos prevenindo a formação de radicais. Os antioxidantes podem ser de origem natural, extraídos de frutos e legumes como os tocoferóis, a vitamina C, os carotenóides e os compostos fenólicos, ou de origem sintética como o butilato de hidroxitolueno (BHT), butilato de hidroxianisol (BHA) e tercbutil-hidroquinona (TBHQ) [13].

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias, os enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e a glutational peroxidase), que são capazes de interromper a iniciação da oxidação, ou seja, são enzimas que removem as ERO. Os antioxidantes não enzimáticos (albumina, ácido ascórbico, α -tocoferol) são moléculas que interagem com as ERO ou com os compostos que intervêm na sua formação, sendo consumidas durante a reação (Figura 1) [14].

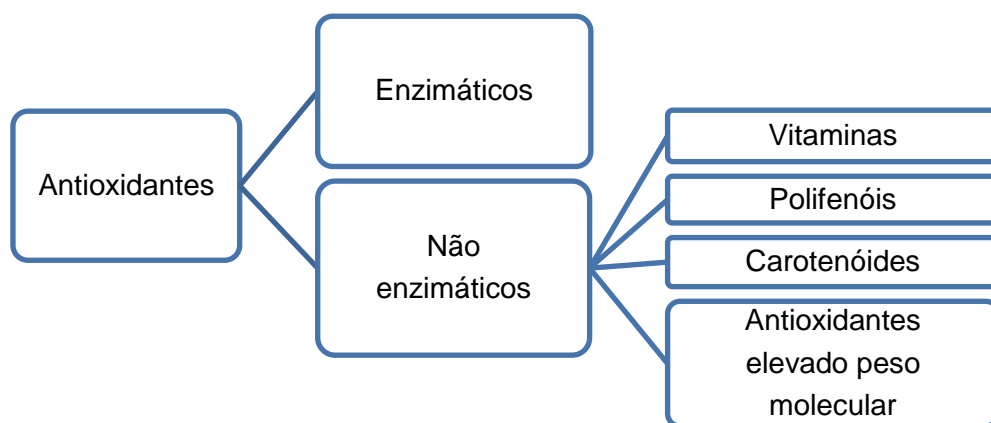


Figura 1. Classificação dos antioxidantes.

Os antioxidantes de baixo peso molecular destacam-se o ácido ascórbico e os compostos fenólicos, particularmente os flavonóides. Entre os antioxidantes de elevado peso molecular as proteínas constituem o principal componente. O BHA, BHT e TBHQ (Figura 2) são os principais exemplos de antioxidantes sintéticos sem atividade enzimática. De entre os antioxidantes naturais destacam-se os tocoferóis e os compostos fenólicos tais como os flavonoides e antocianinas [14].

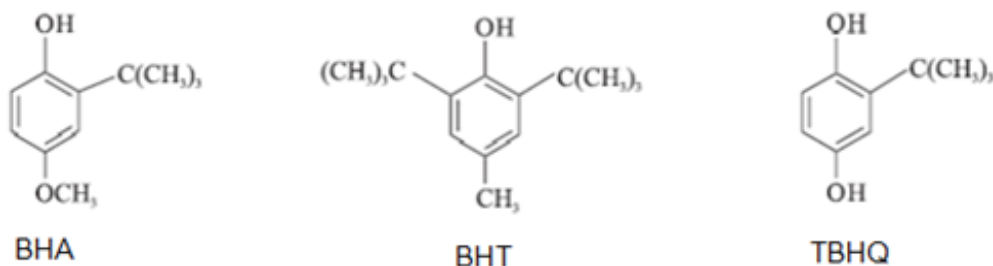
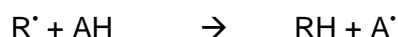
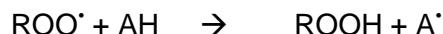


Figura 2. Estrutura molecular dos antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes não enzimáticos exercem a sua atividade pela doação de eletrões e/ou átomos de hidrogénio às espécies reativas (R^\bullet , RO^\bullet e ROO^\bullet), convertendo-as em produtos termodinamicamente mais estáveis ($ROOH$, ROH e RH). Assim, formam-se espécies inativas terminando a propagação da reação em cadeia. Resumidamente, os principais mecanismos de ação anti-radicalar dos compostos antioxidantes encontram-se descritos a seguir:





em que R^\bullet e ROO^\bullet representam os radicais aquíl e peróxido, respetivamente. AH , corresponde à espécie antioxidante com um átomo de hidrogénio ativo; A^\bullet , radical resultante da oxidação AH .

Os compostos antioxidantes (AH) atuam como sequestradores de radicais e por vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários (A^\bullet), formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático que usualmente estas substâncias apresentam [15].

A aplicação de um antioxidante em alimentos deve ter em consideração que este deve ser eficaz em baixa concentração (0,01% ou menos) e deve atender aos seguintes requisitos: compatibilidade com o substrato, não conferir odor ou sabor estranho ao produto, manter eficácia durante o período de processamento do produto, estabilidade durante o processo de aquecimento e facilmente incorporado no alimento. Além desses fatores devem-se considerar também a legislação vigente e os custos envolvidos [16].

Atualmente, a utilização de antioxidantes em produtos alimentares é controlada pela legislação do próprio país ou através de padrões internacionais. Deste modo, apenas alguns compostos reconhecidos como seguros pelas organizações internacionais como a Food and Agriculture Organization (FAO), Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) e a World Health Organization (WHO) são permitidos para o uso alimentar [17]. No entanto, atualmente sabe-se que os antioxidantes sintéticos apresentam um possível potencial tóxico o que levou à restrição da sua utilização em diversos países e para a crescente oposição dos consumidores à utilização destas substâncias [18]. Na *Comunidade Europeia* [17] o uso de antioxidantes sintéticos em alimentos é limitado, estando proibida a adição de tercbutil-hidroquinona (TBHQ), além de que a FAO e a WHO estão constantemente a alterar a ingestão diária aceitável destas substâncias [17]. Há estudos realizados em animais de laboratório (ratos) que evidenciaram que a exposição prolongada e excessiva a antioxidantes sintéticos usados pela indústria alimentar leva ao desenvolvimento de tumores (estômago, pâncreas e glândulas) e alteração das funções hepáticas [1, 19-20].

Sabe-se que os antioxidantes de origem natural possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, de protegerem o organismo contra os processos oxidativos devido ao elevado teor em compostos fenólicos, e são a alternativa economicamente mais viável face à sua abundância e acessibilidade [21].

O uso de antioxidantes naturais em alguns tipos de carne tem sido objeto de estudo em diversas matérias-primas, tais como a carne de frango crua e cozida [21], salsicha de carne de cabra [22], carne de porco [23] e hambúrguer de carne de vaca [24].

Existem estudos onde a utilização de resíduos agroindustriais são utilizados na prevenção da oxidação lipídica e consequente conservação a longo prazo [25]. Alguns dos resíduos são aproveitados como ração animal ou utilizados como fertilizantes naturais. Porém, o facto de muitos deles serem ricos em compostos bioativos, capazes de combater os danos oxidativos causados por radicais livres, o seu desperdício corresponde à perda de uma fonte natural de compostos bioativos [26]. De facto, a investigação sobre a utilização dos resíduos agroindustriais como corantes e/ou antioxidantes tem sido intensificada em diversos setores tais como o farmacêutico, cosmético e nutricional devido ao elevado teor de compostos bioativos. Num desses estudos o extrato de jujuba e o extrato de romã foram utilizados em filmes comestíveis para cobrir amendoins torrados verificando-se eficácia na prevenção da oxidação lipídica [27]. Outro estudo comprovou que a adição de extrato de semente de manga em leite pasteurizado promoveu o aumento da vida de prateleira desse produto devido ao elevado teor de compostos fenólicos, permitiu a redução da contagem total de bactérias, e inibiu o crescimento dos microrganismos do grupo coliforme, além de ter sido comprovado que a sua utilização como aditivo de alimentos é seguro para a saúde humana [28].

As avaliações experimentais relativamente ao uso do urucum (*Bixa orellana* L) têm demonstrado que os carotenóides presentes na sua composição têm capacidade de atuarem como antioxidantes, indicando uma alternativa para substituição dos antioxidantes sintéticos nas aplicações em derivados cárneos [29]. Contudo, a legislação brasileira limita a sua utilização quando aplicado como corante, proibindo ainda o seu uso em carnes frescas ou congeladas.

A atividade antioxidante do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), da páprica (*Capsicum annum*), do cominho (*Cuminum cyminum*), dos orégãos (*Origanum vulgare*) e do açafrão (*Crocus sativus*), foi comparado em meio aquoso com antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) assim como as suas atividades, e verificou-se que a ação antioxidante dos condimentos naturais sobrepõem-se às substâncias sintéticas [25]. Isso sugere uma vantagem na substituição dos compostos sintéticos em alimentos por condimentos naturais, uma vez que, além de oferecerem gosto e cor, também proporcionam estabilidade oxidativa.

O uso individual de substâncias naturais como a norbixina, o caroteno, o licopeno e a zeaxantina, utilizadas como substituintes do antioxidante sintético

(eritorbato de sódio) em salsichas formuladas com mistura de carnes bovina, suína e de frango demonstrou uma redução de aproximadamente 20% nos níveis de malonaldeído [29]. A utilização de extrato de semente de uva (0,01 – 0,02%), alecrim e orégãos pode exercer proteção embora limitada contra a oxidação lipídica em produtos cárneos com maior índice de gordura. Estes extratos, como antioxidantes naturais, quando combinados com o uso da embalagem a vácuo e armazenamento congelado, podem ser considerados um método eficiente para retardar a oxidação lipídica e estabilizar a cor da carne de vaca [30].

O mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) é um pequeno fruto originário da América do Norte que se encontra disponível de Maio a Outubro e que tem ganho um elevado grau de importância graças às suas propriedades nutricionais e medicinais [31]. A maior parte dos compostos bioativos permanece no bagaço de mirtilo sendo por este motivo uma fonte natural de corantes e de compostos com propriedades antioxidantes [31]. Existem estudos onde a tirosina foi utilizada como modelo da oxidação de proteínas e o ácido linoleico como modelo da oxidação de lípidos, e verificou-se que os extratos de mirtilo apresentaram capacidade de inibir a oxidação destas moléculas quando em presença de ERO [32].

O interesse da investigação do mirtilo e das suas propriedades antioxidantes está documentado por cerca de 1000 artigos publicados com as palavras-chave “blueberry and antioxidant”, sendo que aproximadamente 40% destes artigos foram publicados nos últimos 2 anos (informação recolhida no *isi web of knowledge*). A caracterização da capacidade antioxidante deste fruto tem sido documentada em diversos artigos [33], no entanto, não existem atualmente dados sobre o potencial antioxidante do extrato de bagaço de mirtilo e a sua utilidade como conservante alimentar. Recentemente, foi publicado um trabalho sobre as potencialidades antimicrobianas do extrato aquoso de *Vaccinium corymbosum* em produtos alimentares [34], no entanto, a informação disponível na literatura sobre as propriedades antioxidantes das espécies cultivadas em Portugal é escassa.

Mirtilo

Taxonomia e descrição botânica

O mirtilo é uma frutífera que pertence à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae*, na qual se encontra o género *Vaccinium*. É uma planta caducifólia, de porte arbustivo ou rasteiro. As inflorescências consistem em racemos localizados no terço final do ramo. As flores apresentam a corola com pétalas brancas ou rosa, de forma tubular ou em forma de sino. Cerca de 8 a 10 estames estão inseridos na base da corola, contornando o pistilo [35]. As folhas são simples, de forma oval a lanceolada, e caducas, adquirindo uma tonalidade roxa no Outono. O sistema radicular é superficial, sendo as raízes muito finas, não dispendo de pêlos radiculares [36].



Figura 3. Mirtilo (*Vaccinium* sp.).

O mirtilo comercializado *Highbush* (arbusto alto), é uma planta com mais de 2 metros de altura e precisa de 650 a 850 horas de frio hibernar. Dentro do grupo *Highbush* a variedade *Brigitta Blue* precisa de 800 horas de frio hibernar [37], e caracteriza-se por ser um arbusto de bom vigor, apumado, de frutos grandes e de coloração azul, de sabor doce, e de maturação tardia [38]. A Figura 3 representa a imagem do fruto enquanto na Tabela 1 encontram-se descritas as principais características do fruto (*Vaccinium corymbosum*) utilizado no presente trabalho.

Tabela 1. Descrição das características do mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) [39].

Nome	Mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i>)
Tamanho	7 – 12mm de diâmetro
Caraterísticas distintivas	Cor e estrela de cinco pontas na parte superior do fruto.
Cor	Azul, quando alcança o amadurecimento total, ou vermelho segundo a variedade. Coberto por uma cera, denominada pruína.
Sabor	Possui uma pele firme e a sua polpa é sucosa e aromática, de sabor agridoce.

Produção do fruto

A cultura do mirtilo em Portugal é potenciada pelas condições climáticas que lhe oferece, contudo atualmente a cultura dos híbridos é a que permite uma melhor adaptação aos diferentes níveis geográficos [40]. Em Portugal, na zona do médio Vouga, no vale do Rio Vouga, é o local onde se encontra as condições geo-climáticas ideais para a produção deste fruto, mais especificamente nos concelhos de Oliveira de Frades, Sever do Vouga, Águeda e Albergaria-a-Velha. As primeiras plantações de mirtilo surgiram na década de 90, no concelho de Sever do Vouga, representando atualmente a cultura do mirtilo um acréscimo à economia familiar daquela região.

As variedades que apresentam maior interesse para as condições climáticas de Portugal são os “Northern Highbush”, “Southern Highbush” e eventualmente algumas culturas do grupo “Rabbiteye”. Na zona Centro/Norte as plantações que apresentam melhor desempenho pertencem principalmente ao grupo “Northern Highbush”, enquanto que a Sul do Tejo, têm-se revelado interessantes os híbridos dos grupos “Southern Highbush” e “Rabbiteye”, por necessitarem de menos horas de frio [41].

A produção nacional é estimada em cerca de 400 toneladas/ano. Cerca de 95% da produção, tanto em fresco como congelada, destina-se ao mercado externo, quase exclusivamente à União Europeia (França, Holanda e Bélgica), e apenas 5% ao mercado interno (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares).

Caraterização química

Os compostos fenólicos comportam-se como sequestradores de espécies radicalares e possuem propriedades interessantes para a área alimentar, medicinal e nutracêutica. A atividade antioxidante dos mirtilos é influenciada pelo teor em compostos fenólicos, em particular o teor de antocianinas totais presente em elevadas concentrações na película do fruto. A natureza e concentração destes compostos bioativos está dependente do genótipo, das condições ambientais, da maturação, das condições de pré e pós-colheita (armazenamento), do processamento do fruto e dos procedimentos de extração [42].

Nos mirtilos highbush da variedade *Brigitta Blue* a atividade antioxidante aumenta de forma constante para 68% de maturidade (passagem da cor vermelha na película do fruto para a azul), e o conteúdo de antocianinas vai aumentando consoante o amadurecimento do fruto, sendo que em estádios intermédios observam-se valores muito baixos [43]. Há estudos que indicam que a atividade antioxidante dos extratos da película do mirtilo highbush é significativamente maior comparativamente ao fruto inteiro devido à maior quantidade de compostos fenólicos presentes na película, sendo a sua formação um processo que está dependente da intensidade e da duração de luminosidade [44]. Na película são encontradas quantidades elevadas de antocianinas, ácido cafeico e moderadas de ácido ferúlico, enquanto que no fruto inteiro em estadios iniciais de maturação, o ácido clorogénico é responsável pelo alto teor em compostos fenólicos [43].

As antocianinas são pigmentos naturais que pertencem à classe dos flavonóides que são metabolitos secundários dos frutos ou legumes e que na natureza apresentam-se na forma glicosilada [44]. A cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e a malvidina são as seis antocianinas mais comuns que diferem entre si por terem várias substituições de grupos hidroxilo e metoxilo no anel B (Figura 4) [45]. A delphinidina é a principal antocianina encontrada em todos os estádios de maturação, e em quantidades menores a malvidina, cianidina e petunidina [46].

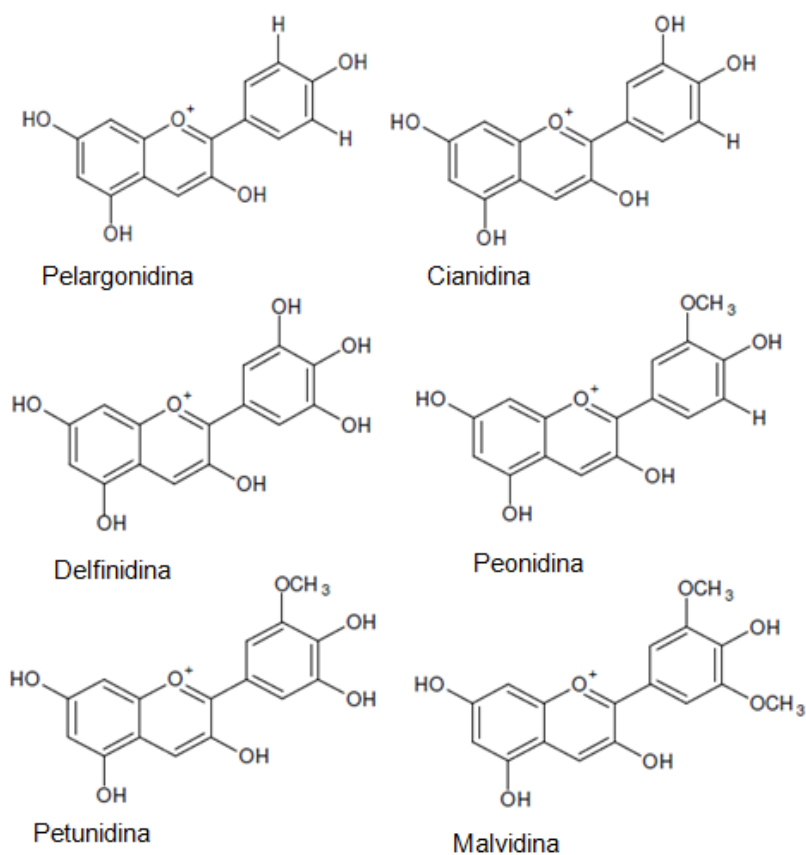


Figura 4. Principais antocianinas encontradas na natureza.

Os mirtilos têm o perfil de antocianidinas mais complexo de entre as bagas mais comuns (amoras e framboesas), contendo mais de vinte e cinco antocianidinas diferentes resultantes da glicosilação das cinco antocianinas (delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, e malvidina) com diferentes tipos de açúcares (glicose, galactose e arabinose) [47].

Os compostos fenólicos e em particular as antocianinas presentes na película dos mirtilos possuem propriedades antioxidantes e quimioprotetores que são benéficas para a saúde humana [48]. Este fruto caracteriza-se pelo baixo teor em gordura, pela baixa densidade energética [31], e possui uma enorme variedade de vitaminas (A, B, C, K, ácido fólico) e elevado teor de minerais tais como o potássio, magnésio, cálcio e sódio [49]. A ingestão regular deste tipo de alimentos ricos em compostos fenólicos tem sido relacionada com a inibição da proliferação de células cancerígenas, prevenindo a incidência de cancro, o aparecimento de doenças coronárias, a diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica [50] e os efeitos do envelhecimento

[31]. As antocianinas têm um grande impacto no controle glicémico pós-prandial por inibição enzimática da α -glucosidase impedindo a degradação do amido, atribuindo assim ao fruto um potencial bariátrico [51]. Para além disso, possuem atividade anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, anti-trombótica, anti-arterogénica e inibição da agregação plaquetária [52].

Indústria alimentar e farmacêutica

Os mirtilos sendo um fruto sazonal e de elevada perecibilidade é usualmente processado de diferentes formas como sumos, purés, geleias ou produtos enlatados para posterior consumo. Durante o processamento do fruto os compostos fenólicos constituintes, em especial as antocianinas, sofrem degradação. A secagem pode diminuir a qualidade nutricional das frutas, assim como influencia o seu perfil fenólico e a sua capacidade antioxidante [53-54]. A perda de compostos fenólicos sem frutas pode ser maior quando do seu armazenamento à temperatura ambiente do que no próprio processamento, isto porque a longo prazo as reações de polimerização das antocianinas com as procianidinas (pigmentos poliméricos) ocorrem com mais frequência [55]. Nas operações unitárias que envolvem posteriormente o embalamento como conservação (fruta enlatada com calda ou fruta em puré) a médio ou longo prazo há uma maior retenção das antocianinas [56-57].

A indústria alimentar direcionada ao setor carnes tem procurado soluções que minimizem a oxidação e aumente o tempo de prateleira. Nesse sentido nos últimos anos intensificou-se a procura de conservantes naturais especialmente de origem vegetal, pois é no resíduo do processamento de frutas (bagaço) e legumes que se encontra a maior parte dos compostos antioxidantes [58]. Por outro lado, os resíduos agroindustriais representam uma fonte de compostos bioativos de grande diversidade e possibilitam a valorização de um produto considerado sem valor comercial. Para além do valor alimentar, os mirtilos têm demonstrado eficácia na redução dos fatores de risco cardiovascular em pessoas com síndrome metabólica [50], no efeito profilático de infeções do trato urinário [59] e em suplementos alimentares para problemas de memória [60].

Extratos de resíduos agroindustriais

Diversas estratégias de extração e tipos de solvente têm sido estudados para a obtenção dos compostos bioativos a partir de resíduos alimentares. O problema coloca-se nos extratos que usam solventes orgânicos (acetona, etanol, metanol) que não são compatíveis com a adição posterior a produtos alimentares [61]. Por este motivo, o extrato a adicionar deve consistir preferencialmente numa solução aquosa contendo os compostos bioativos do resíduo. A utilização de emulsionantes pode ter particular interesse para a dissolução dos compostos lipofílicos em meio aquoso.

Neste contexto, a lecitina que consiste numa mistura de glicolípidos, triglicéridos e fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol) tem sido largamente usada pela indústria alimentar como um emulsionante de origem natural. Este emulsionante está presente numa grande variedade de alimentos tais como na gema do ovo, chocolate e soja [62]. O termo lecitina é, usualmente, utilizado como sinónimo de fosfatidilcolina (Figura 5) que corresponde a um fosfolípido que constitui o principal componente da fração fosfatada que se obtém da gema de ovo. A solubilidade da lecitina em solventes orgânicos varia principalmente de acordo com o grupo polar e com a composição do ácido gordo na molécula.

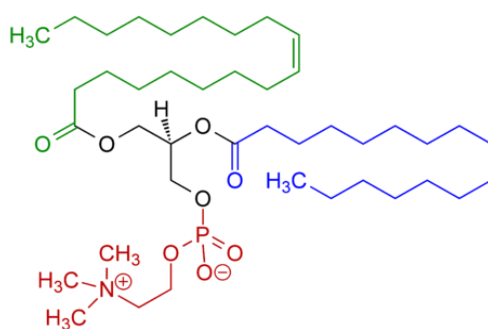


Figura 5. Estrutura molecular da L- α -lecitina.

Os emulsionantes mais utilizados na indústria alimentar são os surfactantes, fosfolípidos, proteínas e polissacarídeos. Cada um destes tem diferentes características elétricas que podem influenciar a formação e as propriedades das interfaces de multicamadas. Em regra os agentes tensioativos não iónicos devem formar gotículas não carregadas, contudo têm uma carga elétrica negativa a pH elevado e positiva a pH baixo [63]. O emulsionante mais adequado para um determinado produto alimentar

depende da matriz e da concentração de todos os ingredientes constituintes do alimento, e das condições a que é submetido durante o processo produtivo [64].

A lecitina é utilizada comercialmente como agente emulsionante, assim como em suplementos dietéticos (lecitina de soja) que foram lançados no mercado nos últimos anos devido à função de suporte da lecitina evitando desperdícios na absorção dos nutrientes [62]. Devido ao seu carácter anfipático, os emulsionantes têm sido usados como camadas de barreira de proteção para evitar trocas de humidade entre o alimento e o meio que o rodeia ou entre os diferentes componentes que constituem o alimento [62]. Desta forma, o uso de solução aquosa de lecitina para redissolução do extrato seco obtido com solvente orgânico pode consistir uma estratégia para a incorporação de compostos com características lipofílicas num meio aquoso.

Objetivo e âmbito

Uma tecnologia emergente para prolongar a vida de prateleira dos alimentos é a utilização de antioxidantes extraídos diretamente de fontes naturais, em particular de resíduos agroindustriais [13]. Tendo como base as limitações dos compostos sintéticos, a indústria alimentar pretende criar novos produtos de origem natural que possam substituir as substâncias químicas ou sintéticas que previnam a oxidação lipídica e proteica. Nesta corrente de ideias, o desenvolvimento de um antioxidante natural extraído do bagaço do mirtilo, um fruto com propriedades antioxidantes, associado aos inúmeros benefícios que o seu consumo oferece ao nosso organismo quando ingeridos, é de grande interesse como conservante alimentar em particular de produtos cárneos.

Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar as potencialidades do extrato de bagaço de mirtilo como conservante alimentar, em particular na prevenção da oxidação proteica. Pretende-se estudar as condições de extração (tipo de solvente, pH, tempo de extração) de forma a selecionar as condições que possibilitem maior rendimento de extração de compostos fenólicos. Pretende-se que o extrato de bagaço de mirtilo a adicionar ao produto alimentar seja um extrato aquoso isento de solvente orgânico e avaliar o uso da lecitina como emulsionante para a redissolução do resíduo seco do extrato de bagaço de mirtilo.

Tendo em consideração estes objetivos, pretende-se determinar o teor de compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante e a capacidade sequestrante de radicais peróxido do extrato aquoso de bagaço de mirtilo com e sem adição de emulsionante recorrendo a ensaios realizados em formato de microplaca. As propriedades antioxidantes do extrato de bagaço de mirtilo serão também determinadas na presença de um substrato proteico (peptona) com o objetivo de determinar qual o tipo de proteção conferida pela amostra ao modelo proteico. Os resultados obtidos no presente estudo serão posteriormente comparados com os valores descritos na literatura.

Materiais e métodos

Reagentes, soluções e equipamentos

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (p.a.). Para a preparação do solvente extrator e das restantes soluções foi utilizada água ultrapura (resistividade > 18 MΩ cm) obtida através de um sistema MilliQ (Millipore, Bedford, EUA). O solvente extrator utilizado foi a solução hidroalcoolica de etanol com água acidificada a pH 2,0 (50/50, v/v) com ácido clorídrico adquirido na Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA).

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) foi diluído 3:10 (v/v) em água e uma solução de Na₂CO₃·10H₂O 24,3% (m/v) foi também preparada. O ácido gálgico (Fluka) foi usado como composto calibrador e a solução padrão de ácido gálgico (200mg/L) foi preparada pela dissolução do respetivo sólido em água ultrapura.

O ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) utilizado para analisar a capacidade antioxidante do extrato de bagaço de mirtilo foi adquirido à Fluka e o persulfato de potássio à Sigma-Aldrich. A solução de radical ABTS^{•+} foi preparada através da mistura de iguais volumes de solução de ABTS stock (7 mM em água) e de solução de persulfato de potássio (2,45 mM em água). Esta mistura foi posteriormente deixada ao abrigo da luz durante 12-16h para a geração do radical ABTS^{•+} e para o consumo total do persulfato de potássio. No dia da análise, concentrações diferentes de ABTS^{•+} foram preparadas em tampão acetato (pH 4,6) e uma relação linear foi estabelecida entre a absorvância e a concentração do radical, de forma a obter uma concentração de radical na microplaca que origine valores de absorvância de 0,800 ± 0,020 a 734 nm. O Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), usado como composto calibrador, foi adquirido à Fluka. A solução padrão de Trolox (1,0 mM) foi preparada pela dissolução do respetivo sólido em etanol/água (10/90, v/v). As restantes soluções padrão foram preparadas pela diluição da solução stock em água.

O 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)dicloridrato (AAPH) utilizado para a geração de radicais peróxido no ensaio de ORAC foi adquirido à Fluka enquanto que a fluoresceína foi adquirida à Sigma-Aldrich. A solução padrão de AAPH (40 mM) foi preparada pela dissolução do respetivo sólido em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4) antes de adicionar à placa. A solução stock de fluoresceína (0,5 mM) foi preparada pela dissolução do respetivo sólido em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4) e guardada a –

4 °C durante 1 semana. A solução padrão de fluoresceína (117 nM) a adicionar à microplaca foi preparada pela diluição da solução stock em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4).

Para a obtenção da solução stock de peptona (Fluka, P0431) de concentração 1000 mg/L pesaram-se 10 mg de peptona que se dissolveram em 10 mL de água ultra-pura.

A lecitina (L- α -fosfatidilcolina de gema de ovo, Tipo XVI-E) usada como emulsionante alimentar foi adquirida à Sigma-Aldrich. A solução de lecitina a 0,3% relativamente ao resíduo seco de extrato de mirtilo foi preparada pela dissolução do respetivo sólido em água.

A pesagem dos reagentes e da amostra foi realizada em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AG285). Após a adição do solvente extrator (etanol/água pH 2,0, 50/50, v/v), as amostras foram colocadas em agitador orbital (GFL 3005). A determinação do teor de compostos fenólicos através do método de Folin-Ciocalteu, da capacidade antioxidante recorrendo ao ensaio ABTS e da capacidade sequestrante de espécies reactivas derivados do oxigénio (radicais peroxilo), foram realizadas em leitor de microplacas de 96 poços (Synergy HT, BioTek – Instruments) usando como sistema de deteção a espectrofotometria (Folin-Ciocalteu e ABTS) e a fluorimetria (ORAC).

Tratamento da amostra de mirtilo

No presente estudo o modelo de amostra utilizado nos ensaios laboratoriais pertence à família Ericaceae, subfamília *Vaccinoideae*, na qual se encontra o género *Vaccinium*. O mirtilo utilizado pertence ao grupo comercializado Highbush da variedade Brigitta, e foi colhido em Monção (alto Minho, Portugal) na segunda quinzena do mês Julho de 2013, numa plantação com três anos e meio de idade e com uma produção anual de meia tonelada. Para a obtenção do bagaço de mirtilo foi necessário que o fruto sofresse quatro operações unitárias sendo elas a liquificação, secagem, trituração e tamisação (Figura 6). O fruto recolhido foi armazenado a -18°C. Assim que retirado da câmara frigorífica foi liquidificado onde houve a separação da polpa e películas do sumo. O resíduo (polpa + películas) foi seco em estufa a 55°C durante duas horas onde se obteve um resíduo seco que foi posteriormente triturado e por último tamisado dando origem a um material sólido com tamanho de grão entre

0,7 e 1,4 mm. Este resíduo seco, triturado e tamisado foi posteriormente armazenado a -18°C para posterior extração dos compostos bioativos.

Assim, após a obtenção do resíduo seco de bagaço de mirtilo procedeu-se ao processo de extração. Para tal, foram adicionados 20 mL de etanol/água pH 2,0 (50/50, v/v) a 500 mg de resíduo seco de bagaço de mirtilo e procedeu-se à extração durante 90 min num agitador orbital a 300 rpm.

Após otimização das condições de extração, foi realizada a extração de uma quantidade superior de bagaço de mirtilo de forma a obter uma quantidade significativa de extrato que permitisse a posterior evaporação do solvente extrator e obtenção de resíduo seco para reconstituição em meio aquoso. Assim, 12,5 g de bagaço de mirtilo foram extraídos com 500mL de etanol/água pH 2,0 (50/50, v/v) em agitação a 300 rpm durante 90 min. De seguida, foi realizada a filtração por vácuo recorrendo ao filtro Millipore HVPH de 45 mm e o filtrado foi concentrado em rotavapor a 50°C . Posteriormente, procedeu-se à pesagem do resíduo seco, pela diferença de peso do balão de evaporação. Estes procedimentos foram realizados em duplicado. O resíduo seco foi de seguida reconstituído em água ou em solução de lecitina a 0,3% de resíduo seco com o objetivo de avaliar a influência do emulsionante na redissolução de compostos bioativos presentes no resíduo da extração. A quantidade de lecitina utilizada foi de acordo com as diretrizes de emulsionantes alimentares [65]. O extrato reconstituído foi separado em aliquotas de 1 mL que foram armazenadas a -18°C para permitir as diversas análises sem ser necessário recorrer ao descongelamento de toda a amostra.

O teor de compostos fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu), capacidade antioxidante (método ABTS) e a capacidade de sequestrar radicais peróxido (método ORAC) foram determinados para a solução aquosa de resíduo de mirtilo na ausência e na presença de lecitina. Os resultados foram expressos em função da massa de resíduo seco obtido e também em função da massa (kg) de bagaço de mirtilo.

Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu em formato de microplaca [66]. O protocolo analítico consistiu na adição de 150 μL padrão de ácido gálico (1,0 – 15,0 mg/L) ou 150 μL de extrato hidroalcoólico de bagaço de mirtilo previamente diluído 1:200 ou 150 μL de extrato aquoso reconstituído com ou sem lecitina (1:200, 1:400, 1:500, 1:600 e 1:800)

e 50 µL de reagente Folin-Ciocalteu (3:10, v/v). De seguida, foi adicionado 100 µL de solução de carbonato (24,3% (w/v)). A redução do reagente de Folin-Ciocalteu a pH alcalino pelas espécies fenólicas foi monitorizada a 760 nm em intervalos de 10 min durante 120 min. A capacidade da lecitina de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu foi analisada pela adição de 150 µL de solução de lecitina a 0,3% com o menor fator de diluição (1:200) em substituição da amostra ou padrão. A absorvância intrínseca da amostra foi analisada pela adição de 50 µL de HCl (0,6 mol/L) em substituição do reagente Folin-Ciocalteu, enquanto que o branco do reagente foi realizado pela adição de 150 µL de água em substituição de amostra. O teor de compostos fenólicos totais (CFT), expresso em mg ácido gálgico /g de resíduo seco de extrato de bagaço de mirtilo, foi calculado pela interpolação do valor de absorvância obtido após 120 min na curva de calibração do ácido gálgico (Figura 6) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{CFT} = ((\text{Abs}_{760\text{nm}} - 0,061) / 0,0449) \times (\text{fator diluição}) \times (\text{volume (L)} / \text{massa (g)})$$

em que o volume de solvente para redissolução do resíduo foi de 50 mL e a massa de resíduo foi calculada pela diferença de peso do balão de evaporação.

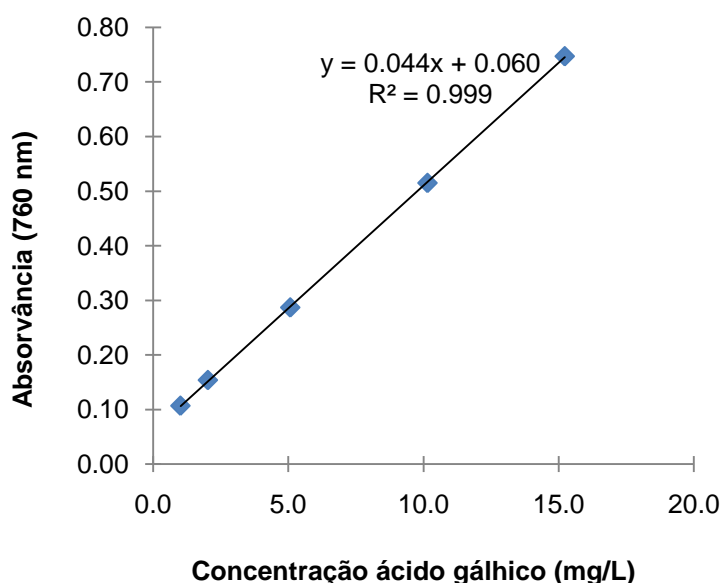


Figura 6. Curva de calibração de ácido gálgico, utilizada para quantificar os compostos fenólicos totais da amostra pelo método de Folin-Ciocalteu.

O estudo das condições de extração (tempo de extração, tipo de solvente e pH) foi realizado pela quantificação dos compostos fenólicos totais extraídos nas diferentes condições testadas. Para a monitorização do processo de extração ao longo do tempo

foram recolhidas alíquotas de 100 µL em intervalos de tempo predefinidos. Várias soluções hidroalcoólicas com diferentes percentagens de etanol e de valor de pH foram testados como solvente extrator tais como: etanol/água pH 2,0 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v); etanol/água pH 5,3 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v); etanol/água pH 9,0 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v).

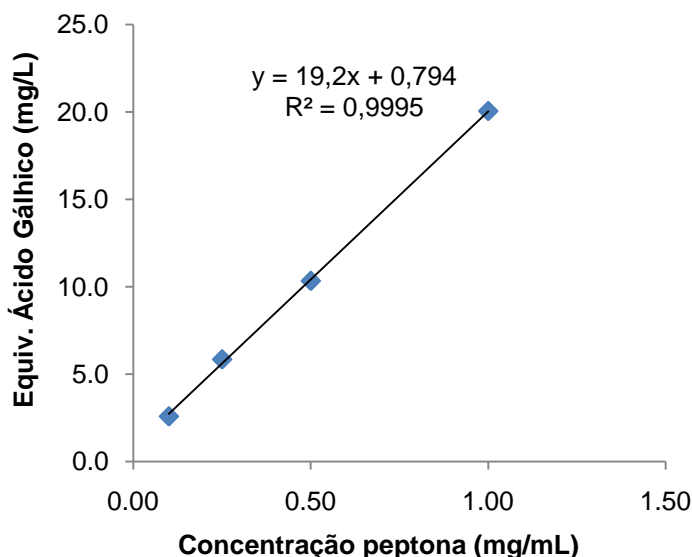


Figura 7. Curva de calibração da peptona para o ensaio de Folin-Ciocalteu.

A capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelo modelo proteico (peptona) foi avaliada recorrendo ao protocolo experimental descrito anteriormente. Desta forma, procedeu-se à adição de 150 µL de soluções padrão de peptona (0,1, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 mg/mL). Devido à presença de grupos fenólicos dos aminoácidos constituintes da proteína verificou-se a existência de uma resposta linear (Figura 7) entre a absorvância (760 nm) e a concentração de proteína presente no meio reacional ($y = 19,2 [\text{peptona, mg/mL}] + 0,794$; $R^2 = 0,9995$). Para a mistura de peptona com extrato de bagaço de mirtilo reconstituído com e sem lecitina, adicionou-se à microplaca 75 µL de peptona (0,1 mg/mL) e 75 µL de amostra previamente diluída (1:100, 1:200, 1:300 e 1:400).

Determinação da capacidade antioxidante (ABTS)

A determinação da capacidade antioxidante do extrato de bagaço de mirtilo reconstituído com e sem lecitina foi determinada pelo ensaio do radical ABTS^{•+} em formato de microplaca. Este método baseia-se na capacidade dos compostos presentes na amostra reduzirem o radical ABTS^{•+} que absorve a 734 nm. Com a redução do radical verifica-se uma diminuição da absorvância e a capacidade antioxidante da amostra é diretamente proporcional à variação de absorvância quantificada ao fim de um período de tempo definido. No presente trabalho, a quantidade de radical ABTS^{•+} reduzido foi determinado ao fim de 300 min, porque corresponde ao tempo reacional em que não se verifica aumento da variação de absorvância [67].

O protocolo laboratorial foi similar ao descrito na literatura [67]. Desta forma, adicionou-se à microplaca 150 µL de solução padrão de Trolox (5,0 – 50 µM) ou 150 µL do extrato de bagaço de mirtilo dissolvido em água ou em solução de lecitina 0,3% previamente diluídas (1:400, 1:500, 1:600 e 1:800). Posteriormente, 150 µL de solução ABTS^{•+} em tampão (pH 4,6) foram adicionados e a cinética de reação entre o radical ABTS^{•+} e os compostos com propriedades antioxidantes foi monitorizada a 734 nm em intervalos de 30 min durante 300 min. A estabilidade do radical ABTS^{•+} durante o período da reação foi avaliada pela adição de 150 µL de água a 150 µL de radical, enquanto que a absorção intrínseca da amostra foi determinada pela mistura 150 µL de amostra com 150 µL de tampão acetato pH 4,6. A capacidade da solução de lecitina 0,3% em reduzir o radical foi determinada pela adição de 150 µL de solução de lecitina a 150 µL de solução do radical.

Cálculo da capacidade antioxidante total

A variação da absorvância a 734 nm, que traduz a quantidade de espécies radicalares reduzidas pelos compostos antioxidantes, foi calculada pela diferença entre a absorvância do radical ABTS^{•+} na ausência e na presença de amostra. Posteriormente, a variação de absorvância determinada aos 300 min de tempo reacional foi interpolada numa curva de calibração de Trolox realizada no mesmo dia (Figura 8). A curva de calibração do Trolox foi determinada através de cinco padrões analisados em quadruplicado. Os valores da capacidade antioxidante da amostra

foram expressos em equivalentes $\mu\text{mol Trolox}$ por grama de resíduo seco de extrato de bagaço de mirtilo.

$$\text{Equiv. Trolox} = [(\Delta \text{Abs}_{734 \text{ nm}} - 0,010) / 10,35] \times \text{fator diluição} \quad (\text{eq. 1})$$

$$C_{(\mu\text{mol Trolox/g})} = \text{Equiv. Trolox (mM)} \times 1000 \times V(\text{L})/m(\text{g}) \quad (\text{eq. 2})$$

Sendo C, capacidade antioxidante expressa em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de resíduo seco; V (L), volume de solvente aquoso usado para a dissolução do resíduo seco (50 mL); m (g), massa de resíduo seco do extrato de bagaço de mirtilo, calculado pela diferença de peso do balão de evaporação.

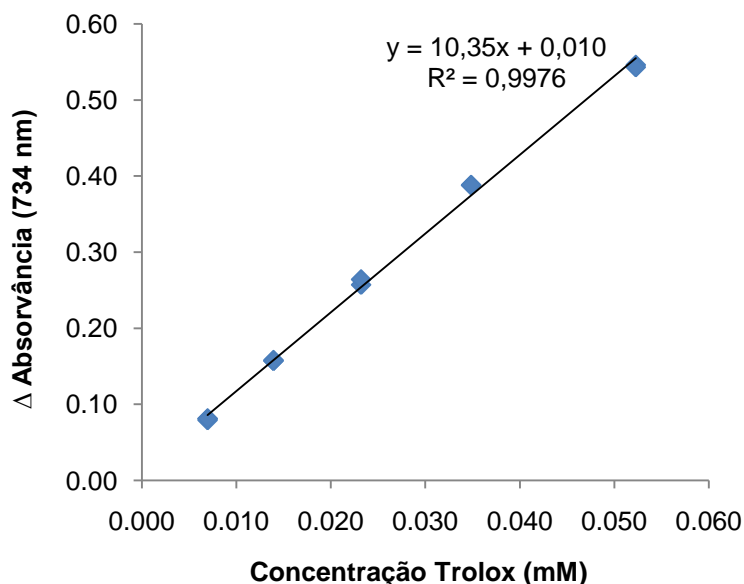


Figura 8. Relação entre a variação de absorvância a 734 nm ao fim de 300 min de tempo reacional e a concentração de Trolox.

Capacidade sequestrante dos radicais peroxilo (ORAC)

A capacidade sequestrante de radicais derivados do oxigénio (ORAC) baseia-se na capacidade da amostra retardar e/ou impedir a oxidação da sonda fluorescente (fluoresceína) pelos radicais peroxilo gerados in situ pela termodecomposição do 2,2'-azinobis-(2-metilpropionamidina) dicloridrato (AAPH) a 37 °C e a pH 7,4 [66].

O protocolo laboratorial em microplaca com deteção fluorimétrica foi similar ao descrito na literatura [66]. Desta forma, 20 μL de Trolox (10 – 100 μM) ou 20 μL extrato de bagaço de mirtilo com ou sem lecitina previamente diluído (1:250, 1:500, 1:1000,

1:1500) foram adicionados a 120 μL de fluoresceína (117nM, concentração no poço de 70 nM). De seguida, a microplaca foi aquecida durante 15 min a 37 °C no interior do leitor. Após este período de aquecimento das soluções, 60 μL da solução de AAPH (40mM, concentração no poço de 12 mM) foi adicionada à microplaca. A monitorização da reação de oxidação da fluoresceína foi realizada pela intensidade de fluorescência (λ_{exc} 485 \pm 20nm, λ_{em} 528 \pm 20nm) determinada em cada minuto durante um período de 240 min. A experiência de controlo foi realizada pela adição de 20 μL de água ou solução de lecitina a 0,3% em substituição da amostra.

A Figura 9 descreve o perfil cinético da oxidação da fluoresceína mediada pelos radicais peroxilo derivados do AAPH (experiência controlo) e na presença de concentrações crescentes de extrato de mirtilo. A intensidade de fluorescência da sonda ao longo do tempo na ausência de radicais peroxilo está também representada.

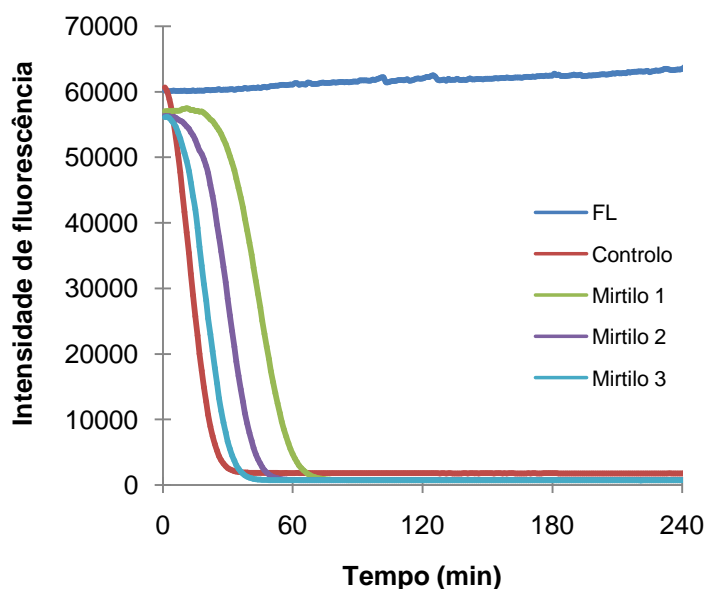


Figura 9. Perfil cinético da oxidação da fluoresceína pelos radicais peroxilo derivados do AAPH na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes de extrato de mirtilo (Mirtilo 1 – 108 mg/L; Mirtilo 2 – 54 mg/L; Mirtilo 3 – 27 mg/L).

As curvas antioxidante (fluorescência vs tempo) foram posteriormente normalizadas (fluorescência relativa, %) e a área sob a curva (AUC) foi calculada pela integração da fluorescência relativa em função do tempo reacional. A área de proteção da amostra (net AUC) foi calculada tendo em conta a seguinte fórmula:

$$\text{netAUC} = ((\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{controlo}}) / \text{AUC}_{\text{controlo}}) \times 100$$

A relação entre o valor de proteção (net AUC) e a concentração do antioxidante padrão (Trolox) foi determinada pela seguinte resposta linear, $\text{net AUC}(\%) = 4,0 \times [\text{Trolox}, (\mu\text{mol/L})]$, $R > 0,995$. O valor de net AUC da amostra foi interpolado na curva de calibração e o valor de ORAC foi expresso em mmol Trolox equivalentes/g de resíduo seco de extrato de bagaço de mirtilo.

O protocolo experimental para determinar o valor de ORAC da peptona e da mistura peptona com extrato de mirtilo reconstituído com água ou solução de lecitina a 0,3% foi similar ao descrito anteriormente. No caso da peptona isolada, foram adicionados à microplaca 20 μL de peptona com as seguintes concentrações (1,0, 2,0, 10,0, 25,0 $\mu\text{g/mL}$). Para a mistura peptona com extrato de mirtilo foram adicionados à microplaca 10 μL de peptona com a concentração fixa de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 10 μL de extrato de mirtilo com os seguintes fatores de diluição (1:125, 1:250, 1:500 e 1:750).

Resultados e discussão

Estudo das condições de extração

O primeiro objetivo do presente trabalho consistiu no estudo das condições de extração a aplicar ao bagaço de mirtilo seco e tamisado de forma a obter o maior rendimento de extração de compostos bioativos. Desta forma, a concentração de compostos fenólicos totais (CFT) determinado pelo método de Folin-Ciocalteu foi estudado para diferentes tipos de solvente, pH e tempo de extração.

Inicialmente, pretendeu-se monitorizar o processo de extração ao longo do tempo usando como solventes a água (pH 5,3), água acidificada (pH 2,0), mistura hidroalcoolica de etanol/água (50/50, v/v) e etanol. O teor de compostos fenólicos totais, expressos em mg de ácido gálico /g de resíduo seco de bagaço de mirtilo, extraídos ao longo de 6h encontram-se descritos na Figura 10.

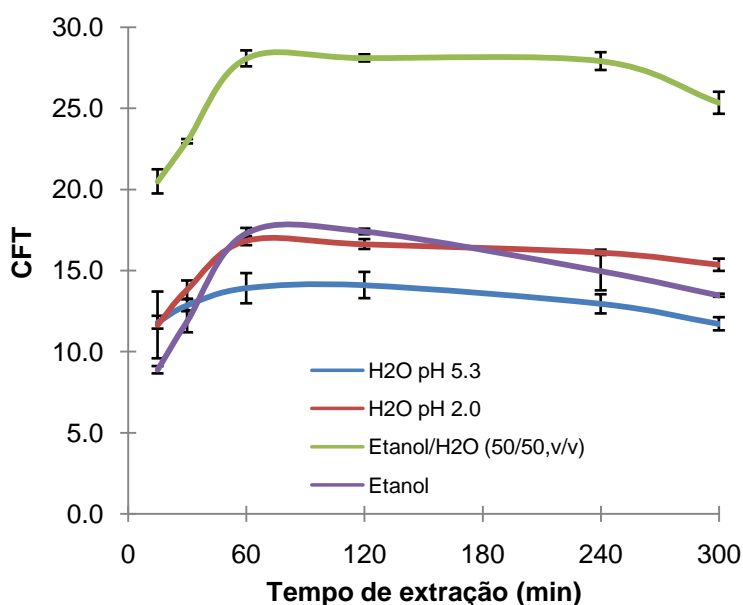


Figura 10. Compostos fenólicos totais (CFT), expresso em mg ácido gálico /g de resíduo seco de bagaço de mirtilo, obtido para os diferentes tipos de solvente ao longo do tempo de extração. Os resultados obtidos representam a média \pm desvio padrão de dois processos de extração independentes analisados em quadruplicado ($n = 8$).

Com base nos resultados obtidos, a mistura etanol/água (50/50, v/v) foi o solvente extrator que apresentou valores mais elevados de fenóis totais extraídos ($25,3 \pm 0,7$ mg /g bagaço de mirtilo). O solvente com menor extração foi a água a pH 5,3 correspondendo a $11,7 \pm 0,4$ mg ácido gálico /g de bagaço mirtilo. Para a água

acidificada a pH 2,0, verificou-se que o teor de CFT extraídos foi $15,4 \pm 0,4$ mg ácido gálico /g de bagaço mirtilo, ou seja cerca de 30% superior ao extraído com água não acidificada. Estes resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura [68].

Para todos os solventes extratores verificou-se que o máximo de CFT extraídos ocorreu após 60 min de extração, desta forma, a cinética de extração é independente do tipo de solvente utilizado. Verifica-se também que existe maior estabilidade dos compostos extraídos quando estão na presença de meio ácido, porque para os restantes solventes o decaimento dos CFT ao longo do tempo de extração é superior. Esta estabilidade superior em meio ácido resulta da protonação dos grupos fenólicos que protege os compostos da auto-oxidação, que ocorre com maior facilidade em meio alcalino [69].

Desta forma, selecionou-se para estudos posteriores a mistura etanol/água (50/50, v/v) como solvente extrator e o tempo de extração foi fixado em 90 min para assegurar o máximo de extração de compostos bioativos.

Tendo em consideração o efeito do etanol e do pH no rendimento da extração e na estabilidade dos compostos ao longo do tempo, procedeu-se ao estudo da extração do bagaço de mirtilo com várias soluções hidroalcoolicas com diferentes percentagens de etanol e de valor de pH. Assim, foi determinado o valor de CFT extraídos ao fim de 90 min com os seguintes solventes: etanol/água pH 2,0 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v); etanol/água pH 5,3 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v); etanol/água pH 9,0 (80/20, v/v), (50/50, v/v), (20/80, v/v). Os resultados obtidos para as diferentes condições encontram-se descritos na Figura 11.

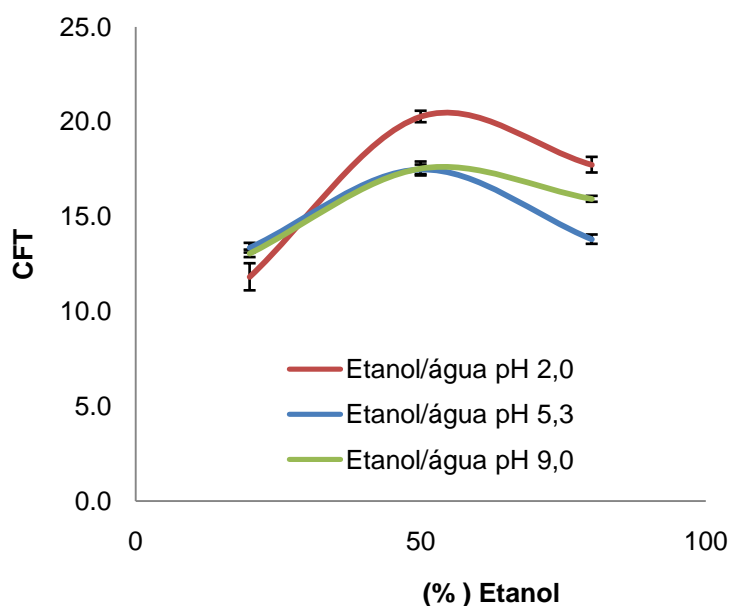


Figura 11. Compostos fenólicos totais (CFT), expresso em mg ácido gálico /g de resíduo seco de bagaço de mirtilo, obtido para diferentes percentagens de etanol (20, 50 e 80%, v/v). Foram testados também três valores de pH (2,0; 5,3; 9,0). Os resultados descritos representam a média \pm desvio padrão de dois processos de extração independentes analisados em quadruplicado ($n = 8$).

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a mistura etanol/água (50/50, v/v) é a que permite maior extração de CFT quando comparado com as restantes percentagens de etanol (20 e 80%). Este resultado verifica-se para todos os valores de pH, o que indica a importância da presença de solvente orgânico para a extração dos compostos bioativos [70].

Relativamente ao valor de pH, verificou-se a maior extração de CFT para o pH ácido (2,0). Este rendimento superior da extração a pH ácido pode ser devido à maior estabilidade dos compostos fenólicos em meio ácido do que em meio alcalino onde o processo de auto-oxidação a semiquinonas e quinonas é acelerado [68]. Por outro lado, as antocianinas, principal componente fenólico deste tipo de amostra, em meio ácido formam o catião flavílio com carga positiva que apresenta maior solubilidade em meio aquoso. O catião flavílio é termodinamicamente estável em soluções fortemente ácidas com $\text{pH} < 2$. Este catião flavílio de cor vermelha, participa em solução aquosa numa série de equilíbrios acoplados envolvendo uma hidratação inicial que produz a espécie incolor hemiacetal, que tautomeriza em chalconas de cor amarelo pálido. A desprotonação do catião produz a forma básica quinoidal, responsável pela cor azul, termodinamicamente mais instável que o catião flavílio. Desta forma, a maior redução do reagente de Folin-Ciocalteu quando a extração decorre em meio ácido pode ser

devido à extração dos compostos fenólicos em formas químicas mais hidrossolúveis e termodinamicamente mais estáveis.

Relativamente aos dados obtidos na Figura 11, o solvente com pH ácido foi o que obteve valores mais elevados de compostos fenólicos extraídos ($20,3 \pm 0,3$ mg ácido gálico /g de bagaço mirtilo) quando comparado com os resultados obtidos com o solvente sem ajuste de pH e com pH básico ($15,5 \pm 0,1$ mg ácido gálico /g de bagaço mirtilo). Os resultados publicados quanto ao teor de CFT extraídos dos mirtilos diferem muito entre trabalhos. Assim num dos estudos realizados, o teor de CFT foi entre 2,50 e 3,10 mg ácido gálico/ g de mirtilo [71], enquanto que em outro estudo realizado em mirtilos brasileiros o teor de CFT variou entre 16,2 e 34,6 mg ácido gálico/ g de mirtilo [33], que são similares aos resultados apresentados no presente trabalho. Noutro estudo são evidenciadas as diferenças entre a variedade do cultivo, as condições geo-climáticas e o ano de colheita verificando-se valores que variaram entre 3,59 e 5,28 mg ácido gálico/ g de mirtilo na colheita realizada em 2006 e 2,79-3,31 mg de ácido gálico/ g de mirtilo na colheita de 2007 [72]. É evidente que as condições geo-climáticas, o ano de colheita e a variedade do cultivo influenciam o nível de compostos bioativos e da atividade antioxidante [33], assim como a temperatura, pois se esta for mais baixa diminui a biossíntese de compostos fenólicos [72].

Avaliação das propriedades antioxidantes do resíduo seco do extrato de bagaço de mirtilo

Após a seleção das condições de extração do bagaço de mirtilo, procedeu-se à extração de uma maior quantidade de amostra (12,5 g) de forma a obter uma quantidade significativa de resíduo seco de extrato. Assim, o extrato etanólico de bagaço de mirtilo foi concentrado até obtenção de um resíduo seco. Esta operação unitária foi realizada em duplicado e verificou-se que a massa de resíduo seco obtida foi de 2,70 e 3,56 g, correspondendo a um rendimento de extração (m/m) de 22 e 28%, respetivamente.

Posteriormente, procedeu-se à dissolução do resíduo seco em água ou em solução de lecitina a 0,3% (relativamente à massa de resíduo seco). O objetivo do uso da lecitina, tal como descrito anteriormente, deve-se à necessidade de avaliar a influência do emulsionante na dissolução de compostos fenólicos do resíduo do extrato de bagaço. Para ambos os extratos, foi posteriormente determinado o teor de

compostos fenólicos totais (CFT), a capacidade antioxidante (ensaio ABTS) e a capacidade de sequestrar radicais peróxido (ensaio ORAC). Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do teor de compostos fenólicos totais (CFT), da capacidade antioxidante e da capacidade de sequestrar radicais peróxido.^a

	Água	Solução lecitina 0,3%
Folin-Ciocalteu		
	36,3 ± 0,6	33,5 ± 0,4
(mg ácido gálico /g resíduo seco extrato)		
ABTS		
	374 ± 42	319 ± 30
(µmol Trolox/ g resíduo seco extrato)		
ORAC		
	337 ± 18	312 ± 16
(µmol Trolox/ g resíduo seco extrato)		

^a Os resultados descritos representam a média ± desvio padrão de quatro fatores de diluição realizados em quadruplicado (n = 16).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o valor de CFT extraídos foi ligeiramente superior para o resíduo dissolvido em água (36,3 ± 0,6 mg ácido gálico /g de resíduo seco) relativamente ao valor obtido com solução de lecitina 0,3% (33,5 ± 0,4 mg ácido gálico /g de resíduo seco). Para a capacidade antioxidante determinada pelo método do ABTS e capacidade sequestrante para os radicais peróxido (método ORAC), verificou-se valores similares para ambos os meios de dissolução do resíduo.

Desta forma, a adição de um emulsionante (L-α-lecitina) não aumentou a fração de compostos fenólicos dissolvidos quando comparado com a água. A lecitina em meio aquoso forma micelas com os grupos polares direcionadas para o exterior formando um núcleo central apolar onde os antioxidantes com carácter lipofílico podem ser incorporados, promovendo a dissolução destes compostos em meio aquoso. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os compostos presentes no resíduo do bagaço de mirtilo têm predominantemente características hidrofílicas sendo dissolvidos em meio aquoso sem o contributo de um emulsionante. Isto está de acordo com o tipo de compostos maioritários do resíduo que são as antocianinas,

compostos antioxidantes solúveis em meio aquoso [43]. Esta estratégia seria contudo interessante de avaliar em extratos ricos em compostos antioxidantes lipofílicos tais como os carotenos e vitamina E.

Estabilidade do bagaço de mirtilo e do extrato aquoso do resíduo seco

No presente trabalho, pretendeu-se estudar a estabilidade dos compostos fenólicos presentes na amostra de bagaço seco e tamisado e no respetivo extrato aquoso do resíduo seco ao longo do tempo (6 meses) de armazenamento a -18°C . Desta forma, o teor de CFT para o bagaço de mirtilo (Figura 12) e respetivo extrato aquoso do resíduo seco com e sem lecitina (Figura 13) foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu.

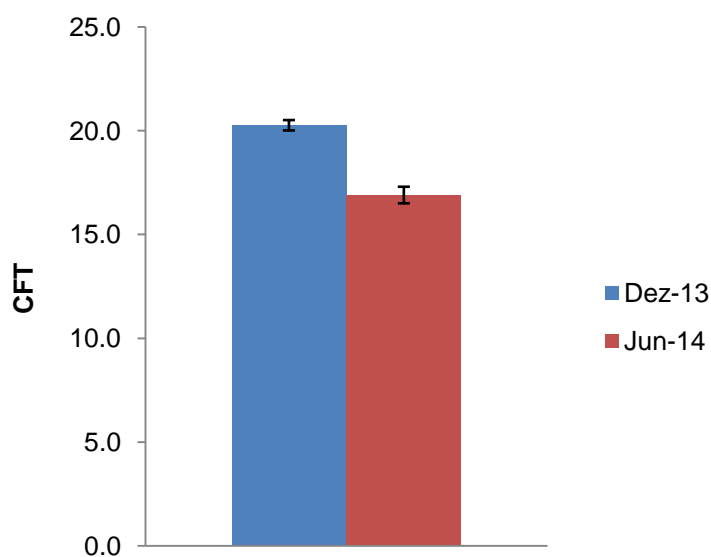


Figura 12. Compostos fenólicos totais (CFT) do bagaço de mirtilo, expresso em mg ácido gálico /g de bagaço de mirtilo, determinado após a obtenção do bagaço (Dez-2013) e após 6 meses (Jun-2014). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três diluições diferentes realizadas em triplicado.

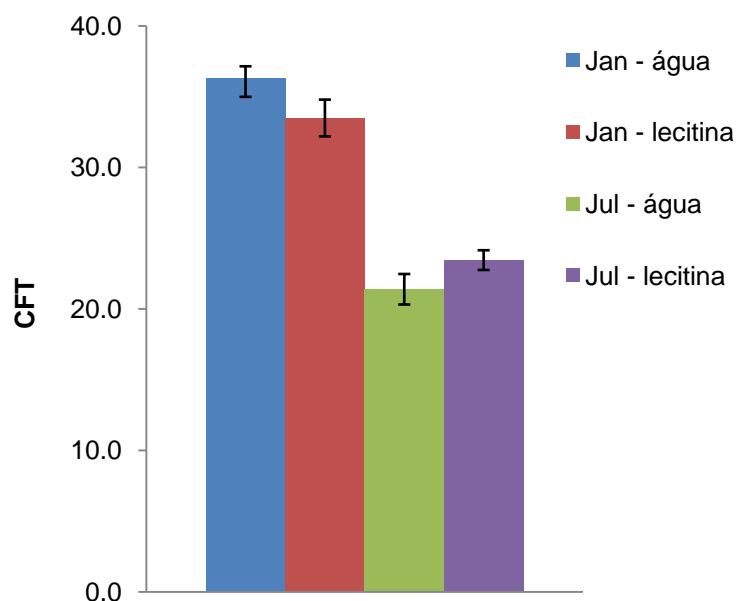


Figura 13. Compostos fenólicos totais (CFT), expresso em mg ácido gálico /g, do extrato aquoso do resíduo seco do bagaço de mirtilo com e sem lecitina determinado num intervalo de 6 meses (Janeiro e Julho 2014). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três diluições diferentes realizadas em triplicado.

Após 6 meses de armazenamento refrigerado (-18°C) verifica-se que há uma diminuição do teor de CFT do bagaço de mirtilo de $20,3 \pm 0,3$ para $16,9 \pm 0,4$ mg ácido gálico /g bagaço mirtilo, correspondente a um decréscimo de 17%. Relativamente ao resíduo seco de mirtilo dissolvido em meio aquoso e em solução de lecitina a 0,3%, o decréscimo observado foi de 41 e 30%, respetivamente. Desta forma, pode-se concluir que o bagaço de mirtilo seco e tamisado apresenta maior estabilidade dos compostos fenólicos do que o respetivo resíduo seco do extrato dissolvido em água ou solução de lecitina a 0,3%. Este resultado deve-se à maior estabilidade dos compostos fenólicos em meio desidratado, porque o meio aquoso promove a oxidação destes compostos [73]. Por outro lado, verificou-se que a solução de lecitina permitiu uma menor degradação do teor de CFT quando comparado com a solução aquosa na ausência do agente emulsionante. Este resultado pode ser devido à capacidade dos ácidos gordos insaturados da lecitina exercerem atividade antioxidante, que não é detetada para estes métodos nesta concentração, mas que pode exercer um efeito protetor na auto-oxidação dos compostos fenólicos.

Avaliação das propriedades antioxidantes do resíduo seco de bagaço de mirtilo na presença de um modelo proteico

Nesta secção pretendeu-se avaliar a capacidade antioxidante do resíduo seco de mirtilo dissolvido em água e em solução de lecitina a 0,3% na presença de um modelo proteico (peptona). A peptona tem a vantagem de ser um hidrolisado de proteínas e não conter a complexidade de matriz de um produto cárneo, sendo possível desta forma concluir sobre o tipo de interação entre a amostra antioxidante e o substrato. Neste contexto, determinou-se o teor de CFT e a capacidade sequestrante para o radical peróxido (ORAC) para três diferentes situações: extrato de mirtilo em água ou em lecitina, peptona, e peptona com extrato de mirtilo). O principal objetivo consistiu em avaliar qual o tipo de interação antioxidante conferido pelo extrato de mirtilo ao substrato proteico.

A Figura 14 descreve os resultados obtidos para o doseamento de CFT para o extrato de mirtilo em água, para a peptona e para a mistura de peptona a concentração fixa com concentrações crescentes de extrato de mirtilo. Resultados similares foram obtidos para o extrato de mirtilo em solução de lecitina a 0,3%.

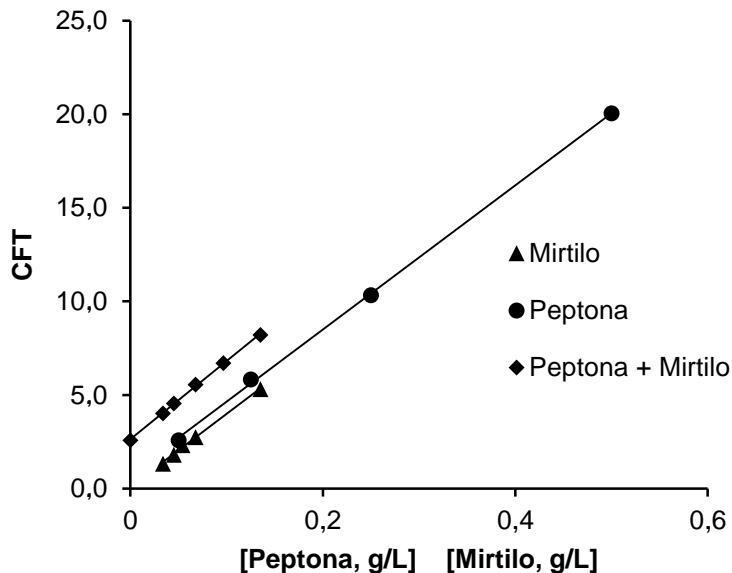


Figura 14. Compostos fenólicos totais (CFT), expressos em mg ácido gálico /L, para mirtilo (0,035 a 0,135 g/L, concentrações no poço), peptona (0,050 a 0,50 g/L, concentrações no poço) e peptona (0,050 g/L) + mirtilo (0 a 0,135 g/L).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o teor de CFT é diretamente proporcional com a concentração de mirtilo e peptona no meio reacional

($R > 0,9998$). A reatividade da peptona para o reagente de Folin-Ciocalteu ocorre devido aos grupos fenólicos presentes nos aminoácidos do hidrolisado proteico. O valor do declive da curva obtida para mistura de peptona (concentração fixa) com concentrações crescentes de mirtilo foi de 40,8 L/mg. Valores similares foram obtidos para o extrato de mirtilo (38,9 L/mg) e peptona (38,6 L/mg). Desta forma, a redução do reagente de Folin-Ciocalteu para a mistura resulta do somatório da capacidade de redução da peptona e do mirtilo. Este resultado indica que o teor de CFT conferido pela adição do mirtilo tem um efeito aditivo sobre o modelo proteico, o que permite concluir que não existem reações de polimerização entre os compostos fenólicos da amostra e os aminoácidos da proteína.

A Figura 15 descreve os resultados obtidos para a metodologia ORAC para o extrato de mirtilo em água, para a peptona e para a mistura de peptona e extrato de mirtilo. Resultados similares foram obtidos para o extrato mirtilo em solução de lecitina a 0,3%.

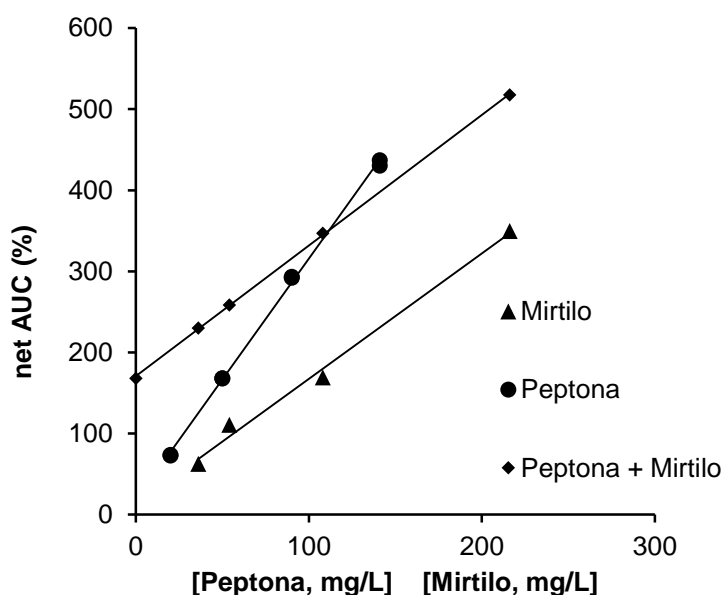


Figura 15. Capacidade sequestrante para radicais peróxido, expressos em percentagem de aumento de área sob a curva (netAUC), para mirtilo (35 a 215 mg/L), peptona (20 a 140 mg/L) e peptona (50 mg/L) + mirtilo (0 a 215 mg/L).

Tal como descrito anteriormente, existe uma relação linear entre a concentração de peptona ou mirtilo e a percentagem de aumento da área sob a curva da experiência controlo, ou seja, o aumento da concentração de amostra confere maior proteção à fluoresceína de sofrer peroxidação. Estes resultados indicam que a capacidade sequestrante de radicais peróxido dos aminoácidos do modelo proteico é

superior à obtida para o extrato de mirtilo, quando analisado em função da concentração (mg/L), porque o declive é superior para a peptona. Isto está diretamente relacionado com a natureza dos compostos fenólicos presentes que podem conter maior ou menor capacidade de sequestrar os radicais peróxido. No método de Folin-Ciocalteu, este resultado não se verifica porque basicamente este método faz uma titulação do teor de compostos fenólicos sendo indiferente a natureza dos compostos presentes.

Em relação à mistura de peptona com concentrações crescentes de mirtilo, verificou-se que a capacidade sequestrante de radicais peróxido (netAUC) é dependente do teor de mirtilo presente no meio reacional, sendo o declive da curva de calibração similar aos valores obtidos na ausência de peptona. Assim, o valor de netAUC resulta do somatório da capacidade sequestrante da peptona em concentração fixa e do teor de mirtilo.

Conclusão

No presente trabalho avaliou-se as propriedades antioxidantes do extrato aquoso do bagaço de mirtilo na presença de um modelo proteico, a peptona. Para a otimização das condições de extração a aplicar ao bagaço de mirtilo de forma a obter o maior rendimento de extração de compostos bioativos, verificou-se que a mistura etanol/água pH 2,0 (50/50, v/v) foi o solvente mais eficaz e que o tempo máximo de extração foi de 90 minutos. Na avaliação da influência do emulsionante (lecitina) na dissolução do resíduo seco do bagaço de mirtilo, concluiu-se que a lecitina não aumentou a fração de compostos antioxidantes dissolvidos quando comprado com a água. Este resultado ocorreu porque os compostos antioxidantes maioritários do bagaço de mirtilo apresentam carácter hidrofílico (antocianinas), não beneficiando da introdução de um agente emulsionante em meio aquoso.

A adição de concentrações crescentes de extrato de bagaço de mirtilo na presença de concentração fixa do modelo proteico (peptona) resulta num efeito aditivo, ou seja, o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade sequestrante para os radicais peróxido resulta do somatório da atividade da peptona e do mirtilo quando analisados isoladamente. A estabilidade ao longo de 6 meses do bagaço de mirtilo seco e tamisado é superior ao extrato do resíduo seco dissolvido em água ou em solução de lecitina a 0,3%.

Para a avaliação do potencial conservante do extrato aquoso de bagaço de mirtilo em produtos cárneos será interessante em determinar a capacidade antioxidante na presença de um modelo lipídico (ácido gordo insaturado, triglicérido) submetido a diversos fatores promotores da oxidação (luz, temperatura, metais). Com base no conhecimento adquirido com estes modelos simples a interpretação posterior dos resultados obtidos em amostras alimentares processadas (hamburger) podem tornar-se mais simplificados.

Referências bibliográficas

1. Borneo, R., et al., *Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system*. Food Chemistry, 2009. **112**(3): p. 664-670.
2. Chelh, I., P. Gatellier, and V. Santé-Lhoutellier, *Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils*. Meat Sci, 2007. **76**(2): p. 210-215.
3. Fuentes, V., et al., *Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure*. Meat Sci, 2010. **85**(3): p. 506-514.
4. Valavanidis, A., et al., *Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006. **64**(2): p. 178-189.
5. Oetterer, M., M.A.B.R. D'arce, and M. Spoto, *Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos*. 2006: Editora Manole Ltda.
6. Beltran, E., et al., *Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries*. Meat Sci, 2004. **66**(3): p. 719-725.
7. Aksu, M.İ. and M. Kaya, *The effect of α -tocopherol and butylated hydroxyanisole on the colour properties and lipid oxidation of kavurma, a cooked meat product*. Meat Sci, 2005. **71**(2): p. 277-283.
8. Decker, E.A., C. Faustman, and C.J. Lopez-Bote, *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality*. 2000: John Wiley & Sons.
9. Kubow, S., *Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods*. Free radical biology and medicine, 1992. **12**(1): p. 63-81.
10. Estévez, M., *Protein carbonyls in meat systems: A review*. Meat Sci, 2011. **89**(3): p. 259-279.
11. Estévez, M., V. Ollilainen, and M. Heinonen, *Analysis of protein oxidation markers α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)- electrospray ionization (ESI)- multistage tandem mass spectrometry (MS)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(9): p. 3901-3910.
12. Pokorný, J., *Natural antioxidants for food use*. Trends in Food Science & Technology, 1991. **2**(0): p. 223-227.

13. Brewer, M., *Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011. **10**(4): p. 221-247.
14. Liu, R.H., *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. J Nutr, 2004. **134**(12): p. 3479S-3485S.
15. Ramalho, V.C. and N. Jorge, *Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos*. Química Nova, 2006. **29**(4): p. 755.
16. Rafecas, M., et al., *Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products*. J Chromatogr A, 1998. **822**(2): p. 305-9.
17. Soares, S.E., *Phenolic acids as antioxidants*. Revista de Nutrição, 2002. **15**(1): p. 71-81.
18. Bannwart, G. and M.d.F. Toledo, *Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ*. Bol. SBCTA, 1999. **33**(2): p. 245-255.
19. Botterweck, A.A.M., et al., *Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study*. Food and Chemical Toxicology, 2000. **38**(7): p. 599-605.
20. Lim, S.N., et al., *Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, Sargassum siliquastrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(13): p. 3862-3866.
21. Sáyago-Ayerdi, S.G., A. Brenes, and I. Goñi, *Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers*. LWT - Food Science and Technology, 2009. **42**(5): p. 971-976.
22. Nassu, R.T., et al., *Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant*. Meat Sci, 2003. **63**(1): p. 43-49.
23. Rojas, M.C. and M.S. Brewer, *Effect of Natural Antioxidants on Oxidative Stability of Cooked, Refrigerated Beef and Pork*. Journal of Food Science, 2007. **72**(4): p. S282-S288.
24. Trindade, R.A., J. Mancini-Filho, and A.L.C.H. Villavicencio, *Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(1): p. 98-104.
25. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006. **99**(1): p. 191-203.
26. Melo, P.S., et al., *Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais*. Ciência Rural, 2011. **41**(6): p. 1088-1093.

27. Wambura, P., W. Yang, and N.R. Mwakatage, *Effects of sonication and edible coating containing rosemary and tea extracts on reduction of peanut lipid oxidative rancidity*. Food and Bioprocess Technology, 2011. **4**(1): p. 107-115.
28. Huber, K., et al., *Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga Ubá (Mangifera indica L.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais*. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, 2012. **6**(1).
29. Garcial, C.E.R., et al., *Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como antioxidantes em produtos cárneos*. Ciência Rural, 2012. **42**(8).
30. Rojas, M.C. and M.S. Brewer, *Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork*. Journal of Food Quality, 2008. **31**(2): p. 173-188.
31. Li, C., et al., *Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Rabbit-eye Blueberry (Vaccinium ashei) in Nanjing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **61**(3): p. 523-531.
32. Smith, M., et al., *Bioactive properties of wild blueberry fruits*. Journal of Food Science, 2000. **65**(2): p. 352-356.
33. Pertuzatti, P.B., et al., *Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries*. Food Chemistry, 2014. **164**(0): p. 81-88.
34. Silva, S., et al., *Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry Vaccinium corymbosum extracts upon food microorganism*. Food Control, 2013. **34**(2): p. 645-650.
35. Sezerino, A.A., *Polinização do mirtilo (Vaccinium corymbosum L.)(Ericaceae) cultivares Misty e O'neal no município de Itá, Oeste de SC*. 2007.
36. Freire, C.d.S., M.d.C.B. Raseira, and L. Antunes, *Solos, nutrição e adubação para mirtilos*. Raseira, M. do CB; Antunes, LEC A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004: p. 43-54.
37. Krewer, G. and D.S. NeSmith, *Blueberry cultivars for Georgia*. University of Georgia Fruit Publication, 2000. **2**.
38. NeSmith, D.S. *Fruit development period of several rabbiteye blueberry cultivars*. in *VIII International Symposium on Vaccinium Culture* 715. 2004.
39. Serrada, F., et al., *Mirtilo guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização*. ADRIMAG, Junho, 2008.
40. Lavadinho, C., M. Sousa, and M. Moldão-Martins, *Influência da data de colheita na qualidade do mirtilo*. Actas do 5º Encontro de Química de Alimentos. Sociedade Portuguesa de Química, 2001: p. 346-348.

41. Sousa, M., et al., *Mirtilo: qualidade pós-colheita*. Edição no âmbito do Projeto PO AGRO DE&D, 2007(556).
42. Castrejón, A.D.R., et al., *Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum) during fruit maturation and ripening*. Food Chemistry, 2008. **109**(3): p. 564-572.
43. Ribera, A.E., et al., *Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.) grown in southern Chile*. Journal of soil science and plant nutrition, 2010. **10**: p. 509-536.
44. Cho, M.J., et al., *Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004. **84**(13): p. 1771-1782.
45. Mueller, D., M. Schantz, and E. Richling, *High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (Vaccinium myrtillus L.), Blueberries (Vaccinium corymbosum L.), and Corresponding Juices*. Journal of Food Science, 2012. **77**(4): p. C340-C345.
46. Määttä-Riihinen, K.R., et al., *Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(14): p. 4477-4486.
47. Gao, L. and G. Mazza, *Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries*. Journal of Food Science, 1994. **59**(5): p. 1057-1059.
48. Seeram, N.P., *Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(3): p. 630-635.
49. Silveira, N., P.N. Vargas, and C. Rosa, *Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush*. Alimentos e Nutrição Araraquara, 2008. **18**(4): p. 365-370.
50. Basu, A., et al., *Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome*. J Nutr, 2010. **140**(9): p. 1582-1587.
51. Wang, S.Y., M.J. Camp, and M.K. Ehlenfeldt, *Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (Vaccinium spp.) cultivars*. Food Chemistry, 2012. **132**(4): p. 1759-1768.
52. Moure, A., et al., *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chemistry, 2001. **72**(2): p. 145-171.

53. Reyes, A., et al., *Effect of operating conditions in freeze-drying on the nutritional properties of blueberries*. Int J Food Sci Nutr, 2011. **62**(3): p. 303-6.
54. Gallegos-Infante, J.A., et al., *Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (Opuntia ficus indica)*. Int J Food Sci Nutr, 2009. **60 Suppl 2**: p. 80-7.
55. Howard, L.R., et al., *Processing and Storage Effect on Berry Polyphenols: Challenges and Implications for Bioactive Properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(27): p. 6678-6693.
56. Brownmiller, C., L.R. Howard, and R.L. Prior, *Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products*. J Food Sci, 2008. **73**(5): p. H72-9.
57. Sablani, S.S., et al., *Effect of thermal treatments on phytochemicals in conventionally and organically grown berries*. J Sci Food Agric, 2010. **90**(5): p. 769-78.
58. Naveena, B.M., et al., *Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties*. Meat Sci, 2008. **80**(4): p. 1304-1308.
59. Jepson, R.G. and J.C. Craig, *A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 738-745.
60. Krikorian, R., et al., *Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults†*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 3996-4000.
61. Flores, F.P., et al., *Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(18): p. 4441-7.
62. Whitehurst, R.J., *Emulsifiers in food technology*. 2008: John Wiley & Sons.
63. McClements, D.J., *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. 1998: CRC press.
64. Guzey, D. and D.J. McClements, *Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **128–130**(0): p. 227-248.
65. Hasenhuettl, G.L. and R.W. Hartel, *Food Emulsifiers and Their Applications*. 2008: Springer.
66. Magalhães, L.M., et al., *Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2014. **20**(1): p. 72-79.

67. Magalhães, L.M., et al., *Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products*. Journal of Food Composition and Analysis, 2014. **33**(2): p. 187-194.
68. Malien-Aubert, C., O. Dangles, and M.J. Amiot, *Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-and intermolecular copigmentation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(1): p. 170-176.
69. Baranac, J.M., N.A. Petranovic, and J.M. Dimitric-Markovic, *Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(5): p. 1694-1697.
70. Piljac-Žegarac, J., A. Belščak, and A. Piljac, *Antioxidant capacity and polyphenolic content of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaf infusions*. J Med Food, 2009. **12**(3): p. 608-614.
71. Giovanelli, G. and S. Buratti, *Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties*. Food Chemistry, 2009. **112**(4): p. 903-908.
72. Dragović-Uzelac, V., et al., *Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia*. Food Technology and Biotechnology, 2010. **48**(2): p. 214-221.
73. Galmarini, M.V., et al., *Stability of Individual Phenolic Compounds and Antioxidant Activity During Storage of a Red Wine Powder*. Food and Bioprocess Technology, 2013. **6**(12): p. 3585-3595.